

Evaluation eines modifizierten Auxanogramms zur Differenzierung von *Malassezia*-Hefen mittels ITS1-rDNA-Sequenzierung

Maren Uhlich

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Evaluation eines modifizierten Auxanogramms zur
Differenzierung von *Malassezia*-Hefen mittels
ITS1-rDNA-Sequenzierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Maren Uhlich

aus Gießen

Gießen 2014

**Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen**

Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Gieler

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Mayser

Gutachter: Prof. Dr. phil. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 29. Oktober 2014

Für Holger, Nick, Jonas, Alena und Nike

1	Einleitung	6
1.1	Die Gattung <i>Malassezia</i>	6
1.1.1	Historie	7
1.1.2	Taxonomie	7
1.1.3	Epidemiologie	8
1.1.4	Morphologie/Physiologie	8
1.2	<i>Malassezia</i> -Spezies assoziierte Hautkrankheiten	9
1.2.1	Pityriasis versicolor	10
1.2.2	Seborrhoisches Ekzem	11
1.2.3	<i>Malassezia</i> -Follikulitis	12
1.2.4	Atopisches Ekzem	13
1.3	Methoden zur Differenzierung von <i>Malassezia</i> -Hefen	13
1.3.1	Konventionelle Methoden	14
1.3.2	Tween®-Assimilationstest.....	15
1.3.3	Molekularbiologische Verfahren	16
1.3.4	Die ITS-Regionen	17
2	Fragestellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Referenzstämme	19
3.1.2	Wildstämme	19
3.1.3	Geräte, Materialien und Chemikalien	20
3.1.3.1	Geräte	20
3.1.3.2	Materialien und Chemikalien	20
3.1.3.2.1	(m)-Dixon-Agar	20

	3.1.3.2.2 (m)-Leeman-Notman-Agar	21
	3.1.3.2.3 Gel-Elektrophorese	21
	3.1.3.2.4 DNA-Extraktion	21
	3.1.3.2.5 PCR	21
	3.1.3.2.6 Auxanografie	22
3.2	Methoden	23
	3.2.1 Anzucht der <i>Malassezia</i> -Stämme	23
	3.2.1.1 modifizierter (m)-Dixon-Agar	23
	3.2.1.2 Leeming-Notman-Agar	24
	3.2.2 Gelelektrophorese	25
	3.2.3 DNA-Extraktion	25
	3.2.4 PCR	30
	3.2.5 Überprüfung der PCR-Produkte durch Elektrophorese...	33
	3.2.6 Analyse der PCR-Produkte durch DNA-Sequenzierung..	36
	3.2.7 Zuordnung von unter Punkt 3.2.6 erhaltenen Nukleotid- sequenzen durch Gendatenbankabgleich	37
	3.2.8 Der E-Wert	40
	3.2.9 Methodologisches Prozedere in der Referenzarbeit von Gutsuz et al.	42
	3.2.9.1 Testung der Tween [®] -Auxanografie als Tween [®] - Cremophor [®] -Auxotypie	43
	3.2.9.2 Entwicklung phänotypischer Differenzierungs- methodik durch Gutsuz et al.	44
	3.2.10 Vergleich der phänotypischen Differenzierungsmethode mit der molekularbiologischen Referenzmethode	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Anzucht der <i>Malassezia</i> -Hefen	48
	4.1.1 Anzucht der <i>Malassezia</i> -Hefen für die Versuche von Gutsuz et al.	48
	4.1.2 Anzucht der <i>Malassezia</i> -Hefen für die Referenz- methode	
4.2	<i>Malassezia</i> -Speziesidentifikation bei Referenz- und Wildstämmen mit der Methodik von Gutsuz et al.....	48
	4.2.1 Testung mit Tween [®] -Cremophor-Auxotypie im	

	Vorversuch von Gutsuz et al.	48
4.2.2	Differenzierungssystem mittels u.a. modifizierter Fettsäure-Auxanografie	49
4.3	PCR, Auftrennung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese und Nachweis im UV-Licht	54
4.4	Analyse der PCR-Produkte und ITS1-rDNA-Sequenzierung mit BLASTN	54
4.5	Ergebnisvergleich der Methodik von Gutsuz et al. mit der Bestimmungsmethode der ITS1-r-DNA-Sequenzierung	58
5.	Diskussion	61
6.	Zusammenfassung	74
7.	Summary	75
8.	Literaturverzeichnis	76
9.	Anhang	100
9.1	Sequenzen der einzelnen Spezies	100
9.2	Photodokumentation	107
10.	Danksagung	113
11.	Lebenslauf	114
12.	Erklärung	115

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Malassezia*

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Differenzierungsmöglichkeiten der verschiedenen Spezies der Gattung *Malassezia*. Im Vordergrund stehen dabei eine phänotypische Differenzierungsmethodik mit modifizierter Fettsäureauxanografie, basierend auf der Verstoffwechselung verschiedener Lipidquellen nach Guého und Faergemann, sowie die molekularbiologische Methode nach Makimura et al. (2000).

Zu Beginn soll ein Überblick über die Gattung *Malassezia* gegeben werden. Die Gattung *Malassezia* (früher *Pityrosporum*) gehört zu den Basidiomyceten und wird unter der Ordnung der *Malasseziales* subsumiert (*Ustilaginomyceten*, *Basidiomycota*) (Boekhout & Gueho, 2003).

Der Hefepilz gehört zur natürlichen Hautflora des Menschen. Dennoch werden die Hefen auch mit einer Reihe dermatologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Heutzutage lassen sich mit Hilfe morphologischer, biochemischer und molekularbiologischer Techniken bereits 14 verschiedene Spezies unterscheiden (Cafarchia et al. 2011, Gaitanis et al. 2012) die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Übersicht bisher beschriebener *Malassezia*-Spezies

Spezies	beschrieben von
<i>M. furfur</i>	Baillon (1889)
<i>M. pachydermatis</i>	Dodge (1935)
<i>M. sympodialis</i>	Simmons and Guého (1990)
<i>M. globosa</i>	Guého et al. (1996)
<i>M. obtusa</i>	Guého et al. (1996)
<i>M. restricta</i>	Guého et al. (1996)
<i>M. slooffiae</i>	Guého et al. (1996)
<i>M. dermatis</i>	Sugita et al. (2002)
<i>M. japonica</i>	Sugita et al. (2003b)
<i>M. nana</i>	Hirai et al. (2004)
<i>M. yamatoensis</i>	Sugita et al. (2004)
<i>M. equina</i> *	Cabañes et al. (2007)
<i>M. caprae</i> *	Cabañes et al. (2007)
<i>M. cuniculi</i> *	Cabañes et al. (2011)

Mayser 2006; *Prohic 2012

Ebenso kann die Gattung *Malassezia* in anthropophile, obligat lipophile Stämme (*M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*) und in zoophile Stämme (*M. caprae*, *M. equina*, *M. pachydermatis*) untergliedert werden (Gaitanis 2009). *M. cuniculi* ist den Zoophilen zuzuordnen (Cabañes 2011).

1.1.1 Historie

Im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen lässt sich die Entwicklung des obligat-lipophilen Sprosspilzes *Malassezia* historisch weit zurückverfolgen.

Bereits 1846 beschrieb Eichstedt die Hauterkrankung Pityriasis versicolor (PV) in Verbindung mit einem Hefepilz, der in den Hautschuppen eines an PV erkrankten Patienten nachgewiesen wurde (Robin 1853). Der Erstbeschreiber des nach ihm benannten typisch runden bis ovalen Sprosspilzes war Malassez im Jahr 1874. In Anerkennung seiner Untersuchungen gab Baillon 1889 dem Hefepilz den Namen *Malassezia furfur* (Sloof 1970).

Das Quantifizieren von *Malassezia* auf normaler menschlicher Haut war zunächst nicht möglich, weil adäquate Kultivierungsmedien fehlten. Leeming et al. führten 1987 schließlich eine erfolgreiche quantitative Untersuchung durch, welche die Verteilung und Keimdichte auf normaler menschlicher Haut von Erwachsenen darstellen konnte. Die höchste Populationsdichte befindet sich jeweils am oberen Stamm, auf der Brust, am Rücken, an den Wangen und am Ohr (Leeming 1987). 1989 gelangen es Guého und Meyer mittels genetischer Analysen anhand des Guanin/Cytosin-Gehaltes drei taxonomische Einheiten zu klassifizieren: *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis* und als nicht-lipophilen Keim *Malassezia pachydermatis*. Mithilfe weiterer Methoden wie der Sequenzierung von rRNS, der Karyotypisierung, der Messung des Guanin/Cytosin-Verhältnisses sowie morphologischer und immunologischer Untersuchungen war die Charakterisierung weiterer vier Spezies möglich: *Malassezia globosa*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia restricta* und *Malassezia obtusa* (Gueho 1996). Die Methoden zur Differenzierung der einzelnen Spezies haben sich stetig weiter entwickelt. Heute stehen die molekularbiologischen Verfahren im Vordergrund, wie die im Rahmen dieser Arbeit angewandte ITS1-rDNA-Sequenzierung nach Makimura et al. (2000).

1.1.2 Taxonomie

Die Gattung *Malassezia* weist einige Merkmale auf, die eine Zugehörigkeit in die Ordnung der Basidiomycota und in die Familie der Cryptococcaceae nahe legen (Kurtzmann 2000,

Hoog 2001). Entscheidend dafür sind die mehrschichtige Struktur der Zellwand (Simmons 1987), die positive Diazonium-Blau-Färbereaktion (Hagler 1981, Simmons 1987) sowie die Fähigkeit zur Bildung der extrazellulären Urease (Sloof 1970).

In der aktuellen Taxonomie werden *Malassezia*-Stämme dem Phylum *Basidiomycota*, dem Subphylum *Ustilaginomycotina*, der Klasse der *Exobasidiomycetes*, der Ordnung der *Malasseziales* und der Familie der *Malasseziaceae* zugeordnet (Gaitanis 2012).

1.1.3 Epidemiologie

Der Hefepilz *Malassezia* gehört zur physiologischen Hautflora des Menschen und vieler anderer Warmblüter (Marples 1965, Sloof 1970). Durch die Lipiddependenz variiert seine Verteilung in Abhängigkeit von der Talgdrüsendichte der menschlichen Haut. Die Kolonisierung beginnt in der Regel in der Pubertät und wird mit der Vergrößerung und funktionellen Reife der Talgdrüsen (Faergemann 1980, Calman 1970) erklärt. Neugeborene und Kinder weisen keine oder nur eine sehr geringe Besiedlung auf. Während der zweiten und dritten Lebensdekade kommt es zur höchsten Keimzahldichte aufgrund der starken Talgdrüsenaktivität (Cotteril 1972). Gleichzeitig ist die Genus als Erreger verschiedener Dermatosen bekannt. Darunter befindet sich als häufigste die Pityriasis versicolor. Hier erwies sich *M. globosa* als dominierende Spezies (Saad 2013). Bei der zweithäufigsten Hautkrankheit, die mit *Malassezia* assoziiert ist, handelt es sich um das seborrhoische Ekzem. Auch diese wird am häufigsten mit *M. globosa* in Zusammenhang gebracht (Sosa 2013). Die *Malassezia*-Hefen zeigen sich sowohl auf künstlichen Nährböden als auch in Hautläsionen als Hyphen- oder Sprosszellform, während auf klinisch unveränderter menschlicher Haut in dieser Arbeit ausschließlich die Sprosszellenphase vorzufinden war.

1.1.4 Morphologie/Physiologie

Die Gattung *Malassezia* besitzt eine mehrschichtige, 0,12 µm dicke Zellhülle, die vermutlich für die hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen verantwortlich ist. Diese Zellhülle, welche sich in eine Außenlamelle, eine mehrschichtig-multilamellöse Wand sowie die Plasmamembran unterteilt, besitzt einen helikalen Aufbau. Weiterhin fällt die Gattung *Malassezia* durch einen hohen Lipidanteil der Zellhülle von 15 % (Thompson 1970) und die Vielseitigkeit der Formen der Sprosszellen auf. Diese können rund, oval oder zylindrisch mit einem Durchmesser von 2-7 µm auftreten (Barfatani 1964, Swift 1965, Keddie 1966, Breathnach 1976, Guillot 1995, Mittag 1994/1995). Bei der Fortpflanzung der Zellen kommt es zur Ausstülpung der Zellwand. Diese enthält einen Tochterkern, der schließlich zur Tochterzelle heranwächst. Eine Querwand bzw. das Septum schnürt die Tochterzelle von der

Mutterzelle ab. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt und kann entweder monopolar oder sympodial erfolgen. Der sympodiale Prozess ist charakteristisch für die Spezies *Malassezia sympodialis*, welche mehr als eine Tochterzelle zur gleichen Zeit bilden kann. Bei der Sprossung bildet sich an der Mutterzelle eine Sprossungsnarbe sowie nach Ende des Vorgangs der typische Sprossungskragen (Simmons 1987, Simmons 1990, Gueho 1996, Ahearn 1998). Um lipophile *Malassezia*-Hefen zu kultivieren, sind folgende Bedingungen notwendig: es muss ein lipidhaltiges Medium verwendet werden, die Temperatur sollte zwischen 32°C und 37°C betragen und der pH einem Wert zwischen 5,5 und 6,5 entsprechen. Bevorzugt werden Basalmedien, die mit einer Lipidquelle wie z.B. Olivenöl beschichtet sind. Solchen Spezialnährböden entsprechen der Dixon- (Van Abbe 1964) und der Leeming-Notman-Agar (Leeming 1987). Voraussetzung dabei ist, dass die Kettenlänge der verwandten Fettsäuren mindestens zwölf Kohlenstoffatome beträgt (Mayser 1999, Nazzaro 1976, Shifrine 1963, Wilde 1968).

1.2 *Malassezia*-Spezies assoziierte Hautkrankheiten

Obwohl es sich bei der Spezies *Malassezia* um einen ubiquitären Hautkeim handelt, der zur physiologischen Hautflora des Menschen gehört, können die verschiedenen Spezies mit Hautkrankheiten assoziiert sein. Dazu gehören unter anderem die Pityriasis versicolor, das seborrhoische Ekzem, die *Malassezia*-Follikulitis und das atopische Ekzem (Sugita 2013). Aufgrund erschwelter Isolierung, Kultivierung und Differenzierung der Spezies wird die Verbindung zu den Erkrankungen jedoch kontrovers diskutiert. Als gesichert gilt die Assoziation zwischen *Malassezia*-Spezies und Pityriasis versicolor sowie der *Malassezia*-Follikulitis (Hort 2006). Für die Differenzierung eignen sich besonders die molekularbiologischen Methoden, wie z.B. die ITS1-rDNA-Sequenzierung nach Makimura et al. (2000). Mittels dieser ist eine schnelle und zuverlässige Identifizierung durchführbar, was ein gezieltes Einsetzen der verschiedenen Antimykotika mit unterschiedlichen Wirkungsspektren ermöglicht (Arikan 2000, Chiou 2000). So wird das Outcome für die betroffenen Patienten verbessert. Außerdem kann anhand molekularbiologischer Methoden eine Identifikation direkt aus dem klinischen Material ermöglicht werden. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die *Malassezia*-assoziierten Erkrankungen.

Tabelle 2: *Malassezia*-assoziierte Erkrankungen

Krankheitsbilder	Pityriasis versicolor	Seborrhoisches Ekzem	<i>Malassezia</i> -Folikulitis	Atopisches Ekzem
Symptome	Pigmentverschiebung, kleieförmige Schuppung	Entzündliche, gerötete, fettig schuppende leicht infiltrierende Herde in seborrhoischen Arealen verbunden mit geringem Juckreiz	Kleine, follikuläre Papeln und Papulopusteln, starker Juckreiz, nach Reiben urtikarielle Reaktion	Ekzeme im Kopf-Nacken-Bereich; verbunden mit Juckreiz, chronisch verlaufend
Diagnose	Mikroskopischer Nachweis von Sprosszellen und Hyphen aus Schuppenmaterial	Histologischer Nachweis: psoriasiforme Epidermishyperplasie, perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate, perifollikulär betonte Spongiose	Histologischer Nachweis: follikuläre Hyperkeratose, dilatierter Follikel, Sprosszellen und entzündliche Infiltrate	Erhöhte IgE-Serumkonzentration, Positiver Pricktest gegenüber Extrakt aus <i>Malassezia</i> -Hefen
Therapie	Topisch: Antimykotika aus der Gruppe der Azole, Propylenglykol, Salizylspiritus Systemisch: Azole wie Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol	Topisch: Antimykotika, Immunmodulatoren wie Tacrolimus, Pimecrolimus Systemisch: Antimykotika	Topisch: antimykotische Therapie mit Azolen, Selendisulfid, Aknetherapeutika Systemisch: Isotretinoin	Systemische und lokale Antimykotika

1.2.1 Pityriasis versicolor

Erstbeschreiber der Pityriasis versicolor war Robert Willan zu Beginn des 19. Jahrhunderts (Shelly 1953). Es handelt sich um eine oberflächliche, chronische Hauterkrankung, welche für gewöhnlich am oberen Stamm, am Hals oder an den Oberarmen lokalisiert ist (Faergemann 2000). Das charakteristisch-klinische Bild umfasst schuppige hypo- oder hyperpigmentierte Läsionen (Sunenshine 1998). Das zusätzliche Auftreten von Entzündungsreaktionen hängt möglicherweise auch von der Fähigkeit des Organismus ab, Komplement im menschlichen Serum zu bilden (Gupta 2003, Nenoff 2001). Ein Vergleich der Hautläsionen zwischen an PV und seborrhoischer Dermatitis (SD) Erkrankten und der Haut gesunder Probanden zeigte, dass *Malassezia globosa* die führende Spezies in Läsionen der Pityriasis versicolor ist (Crespo 1999a, Crespo 1999b). Dieses Ergebnis wurde kürzlich mit Hilfe von auf PCR

basierenden Untersuchungen bestätigt (Lyakhovitsky 2013). Dennoch ist die Isolation mehrerer Spezies aus einer Läsion eines an PV erkrankten Individuums keine Seltenheit und gehört zu den Prädispositionsfaktoren zur Auslösung einer PV (Romano 2013). Die Diagnosestellung wird durch das spezifische klinische Krankheitsbild gestützt. Mikroskopisch zeigen sich im Nativpräparat aus dem Randgebiet der Läsionen Hyphen und Sprosszellen. Aufgrund ihrer Anordnung werden diese als „Spaghetti mit Fleischklöschen“ bezeichnet. Ein Nativpräparat ohne Befund schließt die Diagnose Pityriasis versicolor praktisch aus (Altmeyer 1998). Mit dem zusätzlichen Nachweis von Fluoreszenzphänomenen der Läsionen im Wood-Licht lässt sich die Diagnose bestätigen. Bei dieser Methode treten auch makroskopisch unauffällige Läsionen in Erscheinung und lassen eine bessere Einschätzung des Ausmaßes der Krankheit zu (Hay 1996).

Prädisponierend wirken verschiedene exo- und endogene Faktoren auf den Ausbruch der Pityriasis versicolor. Exogene Faktoren beinhalten hohe Temperaturen und eine hohe Luftfeuchtigkeit, welche das gehäufte Vorkommen in den Tropen erklärt. Zu den endogenen Faktoren gehören eine stark lipidhaltige Hautflora, Hyperhidrosis, genetische Faktoren sowie Therapien mit Kortikosteroiden und Immunsuppressiva (Faergemann 2000).

Die Hautkrankheit befällt besonders häufig Heranwachsende in der Pubertät. Dies hängt mit der vermehrten Aktivität der Talgdrüsen und dem damit erhöhten Fettgehalt der Haut zusammen (Gupta 2003). Auch wirken sich Schwangerschaft und Diabetes mellitus prädisponierend aus (Altmeyer 1998). Wird die Krankheit nicht behandelt, kann es zu chronischen Rezidiven kommen. Es werden Rezidivraten von bis zu 60-80 % in den ersten zwei Jahren beschrieben. Die Therapie wird zunächst mit einer lokalen Behandlung begonnen. Sie ist sowohl kostengünstig als auch zur Intervallanwendung und somit zur Rezidivprophylaxe geeignet. Im Vordergrund steht die Behandlung des gesamten Körpers. Bewährt haben sich die Wirkstoffe Ketoconazol und Econazol in Form von Cremes oder Lösungen. Als Alternativen gelten alle anderen Azolantimykotika und weitere antimykotisch wirksame Substanzen. Eine systemische Therapie ist indiziert, wenn es bei Complianceproblemen zu besonders ausgedehnten Herden und häufigen Rezidiven kommt. Geeignet für die Behandlung sind die Azole wie Itra- und Fluconazol. Da Terbinafin nicht mit dem ekkrinen Schweiß ausgeschieden wird, ist es systemisch appliziert unwirksam (Hort 2006, Nenoff 2001).

1.2.2 Seborrhoisches Ekzem

Das seborrhoische Ekzem ist ebenfalls eine häufige *Malassezia*-assoziierte Erkrankung. Sie weist bei Immunkompetenten eine Prävalenz von 1-3 % und bei Immunsupprimierten eine

von 30-83 % auf (Smith 1994). Symptome zeigen sich in den seborrhoischen Arealen wie der Nasolabialfalte, den medialen Augenbrauen, den Ohren oder der Kopfhaut. Sie äußern sich als entzündlich-gerötete, fettig-schuppene, leicht infiltrierte Herde, verbunden mit geringem Juckreiz. Zur Diagnosestellung zieht man das histologische Bild heran, welches dem der Psoriasis vulgaris ähnelt. Es zeigen sich psoriasiforme Epidermishyperplasie, perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate sowie eine diskret perifollikulär betonte Spongiose.

Die genaue Beziehung zwischen *Malassezia*-Spezies und dem seborrhoischen Ekzem wird noch immer kontrovers diskutiert. Dass ein Zusammenhang besteht, belegt die Wirkung der Antimykotika auf diese Erkrankung. Nicht geklärt ist, ob die erhöhte Besiedlungsdichte von *Malassezia*, wie einzelne Studien zeigen (McGinley 1975), oder ein verändertes Reaktionsmuster der Patienten auf die Hefen Auslöser für die Krankheit sind (Bergbrant 1989). Die Therapie erfolgt primär topisch. Als geeignet gelten Präparate wie das Ciclopiroxolamin, Azole, Terbinafin, Tacrolimus, Pimecrolimus und Zinkpyrithion.

In einer Studie wurden außerdem ein Miconazol-haltiges und ein Ketoconazol-haltiges Shampoo in Bezug auf die Effektivität und Zuverlässigkeit in der Behandlung des seborrhoischen Ekzems auf der Kopfhaut getestet. Hier erwies sich das Miconazol-haltige Shampoo als das Geeignitere (Buechner 2013).

Systemische Antimykotika werden nur bei stark ausgeprägten Befunden oder häufigen Rezidiven empfohlen.

1.2.3 *Malassezia*-Follikulitis

Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung *Malassezia*-Follikulitis bereits 1969 von Weary sowie 1973 von Potter. Klinisch finden sich kleine follikulär gebundene Papeln und Papulopusteln. Sie treten besonders im Bereich von Brust und Rücken auf. Es kommt zu starkem Juckreiz und nach Reiben auch zu urtikariellen Reaktionen (Faergemann 1988). Unklar ist ein gemeinsamer Prädispositionsfaktor, besonders bei immunsupprimierten Individuen (Alves 2000). Hier kann es auch zu einem wenig ausgeprägten Juckreiz kommen (Crespo 2010). Die Diagnose wird histologisch gestellt. Hier finden sich follikuläre Hyperkeratosen, dilatierte Follikel und Sprosszellen im gestauten Sebum. Außerdem kommt es zu entzündlichen Infiltraten, welche ebenfalls Hefezellen enthalten. Die *Malassezia*-Follikulitis tritt gehäuft bei jungen Erwachsenen auf. Prädisponierend wirken hohe Temperaturen, Luftfeuchtigkeit, Okklusion und antibiotische Therapien besonders mit Tetracyclinen. Eine untergeordnete Rolle spielen vermehrte Oberflächenlipide, Immunsuppression, Schwangerschaft und Diabetes mellitus. Therapeutisch verwendet man in

erster Linie Antimykotika aus der Gruppe der Azole. Ebenso geeignet sind Selendisulfid, Aknetherapeutika und systemisch Isotretinoin.

1.2.4 Atopisches Ekzem

Beim atopischen Ekzem handelt es sich um eine chronisch verlaufende, entzündliche Dermatose. Kennzeichnend sind Ekzeme und starker Juckreiz. Als Ursache wird eine Verbindung aus veränderter Immunreaktivität und defekter Hautbarriere (Cork 2009) mit verschiedenen äußeren Faktoren als Auslöser vermutet. Bei 80 % der Patienten kommt es zu einer Hautreaktion vom Soforttyp durch Umweltallergene, verbunden mit einer erhöhten IgE-Serumkonzentration (Bieber 2008).

Clemmensen und Hjorth zeigten bereits 1983 einen Zusammenhang zwischen atopischem Ekzem und *Malassezia*-Hefen. Durch die Behandlung mit Ketoconazol kam es bei den Patienten zu einer Besserung. Führt man bei diesen zusätzlich einen Pricktest mit *Malassezia*-Hefen-Extrakt durch, fiel der Test positiv aus (Clemmensen 1983).

Therapeutisch wirksam sind, wie weitere Studien zeigten, sowohl systemische als auch lokale Antimykotika. Welches Patientenkontingent von der Behandlung profitiert, wird an verschiedenen Kriterien wie dem positiven Prick- und Atopie-Patch-Test als auch dem spezifischen IgE-Nachweis festgemacht.

1.3 Methoden zur Differenzierung von *Malassezia*-Hefen

Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts war man in der Lage, *Malassezia*-Hefen zu kultivieren. Sie werden auch als lipophile Hefen bezeichnet, denn ihr Stoffwechsel hängt von langkettigen Fettsäuren ab. Aus diesem Grund bedingt ihre Anzucht, mit Ausnahme der einzigen nicht obligat-lipophilen Hefe *M. pachydermatis*, eine Supplementierung dieser Fettsäuren im Medium (Guheo 1996, Nazzaro-Porro 1976, Shifrine 1963). Sie dienen der Hefe als Energiequelle und Baustein für die Membranbiosynthese. Zwar kann die Zugabe von Glukose und Asparagin (Nazzaro-Porro 1976) oder Asparagin, Thiamin und Pyridoxin (Benham 1939) zum Nährmedium als wachstumsstimulierend angesehen werden, dennoch sind sie allein nicht in der Lage, eine Anzucht zu ermöglichen. Als geeignete Medien haben sich sowohl der m-Dixon-Agar als auch der Leeming-Notman-Agar erwiesen. Um die angezüchteten Hefen anschließend differenzieren zu können, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Es handelt sich dabei um die biochemische sowie die phänotypische Charakterisierung als konventionelle Methoden und um die molekularbiologische Vorgehensweise als innovatives Verfahren.

1.3.1 Konventionelle Methoden

Mit Hilfe der konventionellen Methoden erfolgt die Differenzierung der verschiedenen *Malassezia*-Spezies auf der Grundlage einer Kombination biochemischer, physiologischer und morphologischer Kriterien wie dem Verhalten auf Sabouraud-Dextrose-Agar oder (m)-Dixon-Agar, dem Verhalten auf Selektivagar für pathogene Pilze, der Katalasereaktion, der Spaltung von Eskulin, der Cremophor EL[®]-Assimilation, der Lichtmikroskopie und der Fettsäureverstoffwechselung anhand der Tween[®]-Assimilation. Weitere Differenzierungsmöglichkeiten für *Malassezia furfur* stellen die Glycin-Verwertung, die Pigmentproduktion und die Polidocanol-Empfindlichkeit dar.

Mittels Sabouraud-Dextrose-Agar können die lipid-abhängigen *Malassezia*-Spezies von der nicht obligat lipid-abhängigen *Malassezia pachydermatis* abgegrenzt werden.

Der Nachweis von Katalaseaktivität erfolgt als Objektträger test (Guillot 1996). Durch die Katalase erfolgt die Spaltung des durch Oxidationsreaktionen entstehenden Wasserstoffperoxyds, welches enzymkatalysiert in H₂O und O₂ transformiert wird. Der Sauerstoff entweicht im Testansatz unter Blasenbildung. Entstehen nach Zugabe von Wasserstoffsuperoxid Gasblasen mit anhaltender Schaumbildung, ist der Test als positiv zu werten. Keine Katalaseaktivität ist allein *Malassezia restricta* zuzuschreiben (Guillot 1996).

Anhand des Eskulinagars wird die β -Glukosidase-Aktivität der verschiedenen *Malassezia*-Spezies zur Differenzierung herangezogen (Mayser 1997). Durch die Spaltung von Eskulin in Eskuletin, Glukose und Eisensalz wird der hellbraune Agar dunkelbraun gefärbt. Positiv fällt der Test für *M. sympodialis*, schwach positiv für *M. furfur* und negativ für *M. slooffiae* aus. Faergemann führte den Test ergänzend mit *M. sympodialis*, *M. obtusa* und *M. globosa* durch und kam zu dem Ergebnis, dass sowohl *M. sympodialis* als auch *M. obtusa* Eskulin spalten, während *M. globosa* im Test negativ ausfällt (Faergemann 2002).

Bei der Cremophor EL[®]-Assimilation handelt es sich um einen Agardiffusionstest. Die Hefen werden bei 32°C inkubiert und auf Wachstumshöfe um das Cremophor EL[®] untersucht. Diese zeigten sich beim *M. furfur* bereits nach sechs Tagen, während *M. sympodialis*, *M. slooffiae* und *M. globosa* erst nach zehn Tagen mit nur sehr schwachem Stoffwechselprozess imponieren (Mayser 1997).

Glycin als alleinige Stickstoffquelle in einem Nährmedium ermöglicht nur *M. furfur* das Wachstum und unterscheidet diese Hefe damit von den anderen Spezies (Murai 2002).

Die Pigmentproduktion ist eine Fähigkeit des *M. furfur*. Dieser benötigt lediglich ein Wachstumsmedium, bestehend aus einer Lipidquelle und der Aminosäure Tryptophan. Er verursacht die Bildung eines im UV-Licht fluoreszierenden Pigments (Mayser 1998). Alle untersuchten obligat lipophilen non-furfur Stämme sind dazu nicht in der Lage.

Die Polidocanol-Empfindlichkeit unterscheidet ebenfalls *M. furfur* von den übrigen Stämmen. Das antipruriginöse und analgetische Lokaltherapeutikum benötigt zehnfach höhere Konzentrationen zur Wachstumshemmung als bei non-furfur-Stämmen (Mayser 1997).

Eine weitere phänotypische Methode ist der Tween®-Assimilationstest, der unter Punkt 1.3.2 näher beschrieben wird.

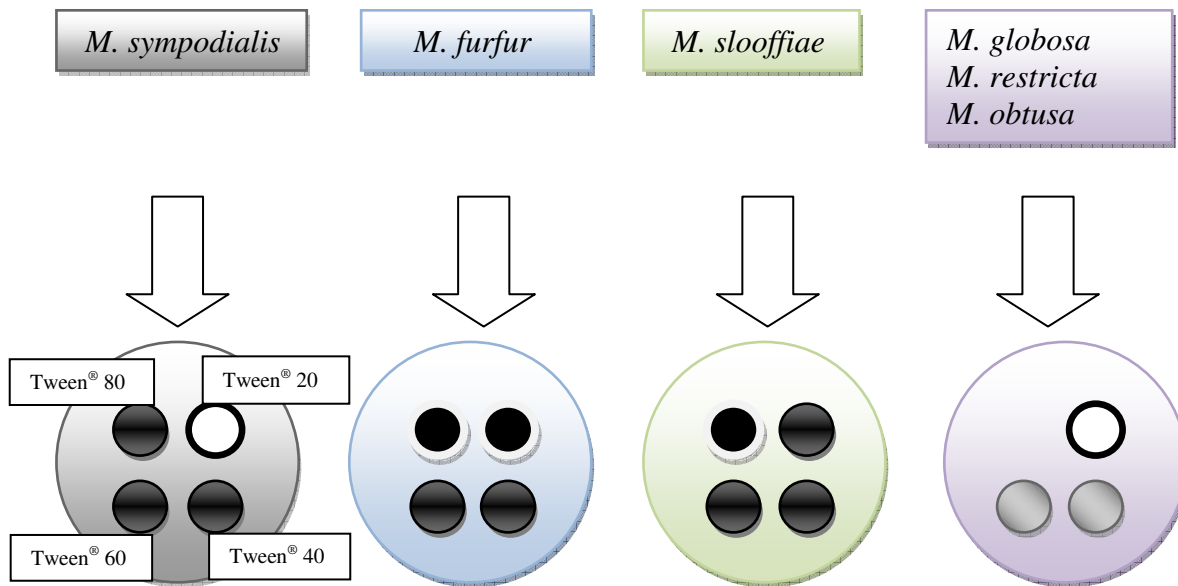
Mittels Mikroskopie kann die mikromorphologische Zuordnung verschiedener *Malassezia*-Spezies erfolgen. Diese ist in Tabelle 7 unter Punkt 3.2.9 aufgeführt.

1.3.2 Tween®-Assimilationstest

Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung von *Malassezia*-Spezies ist der Tween®-Assimilationstest, den Guého und Guillot als einen zentralen Bestandteil eines von ihnen entwickelten Differenzierungsschemas 1996 publizierten. Durch diesen ist es möglich, anhand der Unterschiede in der Verstoffwechselung bestimmter Lipidquellen verschiedene *Malassezia*-Spezies zu identifizieren.

Bei der Tween®-Testung werden verschiedene Polysorbat-haltige Lipidquellen als Tween® 20, Tween® 40, Tween® 60 und Tween® 80 in Stanzungen auf Agar-Platten den *Malassezia*-Kulturen als Substrate zur Assimilation exponiert. Dazu werden die Tweens in Mehrfachkulturschalen wie zuvor beschrieben präpariert, mit *Malassezia*-Stämmen beimpft und im Brutschrank bei 32°C für 21 Tage inkubiert. Anhand des unterschiedlichen Wachstumsmusters und der vermutlich durch Hydrolyse entstandenen Präzipitate mit nicht-löslichen Fettsäuren auf den verschiedenen Lipidquellen sind nach Guého und Guillot so *M. furfur*, *M. sympodialis* und *M. slooffiae* voneinander abgrenzbar. *M. globosa*, *M. obtusa* und *M. restricta* können hingegen nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden und erfordern weitere Tests zur genauen Speziesidentifizierung. Im 1996 veröffentlichten Differenzierungsschema von Guého und Guillot ist daher die Testung auf Tween®-Assimilation neben der Subkultivierung auf Sabouraud-Dextrose-Agar mit zusätzlicher mikroskopischer Untersuchung morphologischer Charakteristika und Prüfung auf Katalaseaktivität die Spezies-Zuordnung der *Malassezia*-Hefen kombiniert. Grafik 1 veranschaulicht die Wachstumsmusterzuordnung der genannten Spezies im Differenzierungsschema von Guého und Guillot 1996 auf der folgenden Seite. Tween® 20 verursacht Hemmhofeffekte bei *M. sympodialis* wie *M. globosa*, *M. restricta* und *M. obtusa*.

Grafik 1: Überblick über das unterschiedliche Wachstum der Spezies im Tween®-Auxanogramm: im Uhrzeigersinn in Stanzungen auf Agarplatten enthaltene Tween®-Lipidquellen: Tween® 20, Tween® 40, Tween® 60, Tween® 80. Schwarz: Wachstum, weiss: Hemmhof



1.3.3 Molekularbiologische Verfahren

Die Taxonomie von *Malassezia*-Hefen war über Jahre nur anhand morphologischer Kriterien möglich. Erst 1996 wurde eine molekularbiologische Methode angewandt: Die Charakterisierung der großen Untereinheit der ribosomalen DNA (D1/D2). Mit ihrer Hilfe kam es zu einer Neuordnung der Gattung. Zu dieser Zeit waren bereits sieben Spezies bekannt: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* (Guillot 1995, Guého 1996). Ab diesem Zeitpunkt wurden weitere molekularbiologische Differenzierungsmöglichkeiten entwickelt und verschiedene Studien durchgeführt. Mit Hilfe dieser Verfahren ließen sich neue Spezies klassifizieren: *M. equi* (Nell 2002), *M. dermatis* (Sugita 2002), *M. japonica* (Sugita 2003 b), *M. nana* (Hirai 2004) und *M. yamatoensis* (Sugita 2004). In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen molekularen Differenzierungsmöglichkeiten mit ihren Zielsetzungen dargestellt (Mayser 2006), unter anderem die in dieser Arbeit angewandte Sequenzierung der ITS-Region nach Makimura et al. (2000).

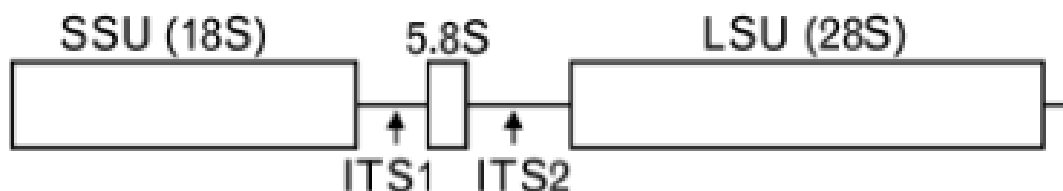
Tabelle 3: Geeignete molekulare Methoden für die verschiedenen Zielsetzungen (Mayser 2008)

Zielsetzung der Studie	Geeignete Methode
Spezies Identifikation	Sequenzierung der LSU (D1/D2); PGFE, Sequenzierung der rDNA (IGS, ITS1/ITS2), PCR-Restriktionsendonuklease-Analyse (REA), RFLP
Stamm-Typisierung für die epidemiologische Untersuchung	RFLP, AFLP, RAPD
In-vivo Diagnostik	Nested-PCR zur Amplifikation der ITS-Region und RFLP

1.3.4 Die ITS-Regionen

Bei den ITS-Regionen handelt es sich um zwei der meist genutzten DNA-Abschnitte für die umfassende Typisierung der *Malassezia*-Spezies (Gaitanis 2009). Sie liegen innerhalb des DNA-Stranges als Teil der ribosomalen DNA (rDNA). Diese enthält die Gene für ribosomale RNA (rRNA). rRNA ist ein wichtiger Bestandteil der Ribosomen, die wiederum für die Proteinbiosynthese (Translation) notwendig sind. Bei der rRNA handelt es sich um eine strukturelle Ribonukleinsäure (RNA), deren Information nicht in Proteine umgeschrieben wird. Die zytoplasmatischen Ribosomen der Eukaryoten enthalten vier verschiedene rRNAs. Diese können bis zu 90 % der Gesamt-RNA einer Zelle ausmachen. Für die Produktion derart großer Mengen werden für jede der vier rRNAs viele Gene benötigt. Die Gene von Dreien (die der 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA) liegen jeweils direkt hintereinander und werden gemeinsam transkribiert, und zwar von der RNA-Polymerase I. Solche Transkriptionseinheiten liegen in großer Zahl als tandemartige Wiederholungseinheiten vor und bilden die eigentliche rDNA. Die 18S-, 5,8S und 28S-rRNA-Gene dieser Transkriptionseinheit werden auf DNA-Ebene durch zwei sogenannte „*internal transcribed spacer*“ (ITS) getrennt (http://de.wikipedia.org/wiki/Ribosomale_DNA).

Abbildung 1: ITS - interner transkribierte Spacer, LSU - große Untereinheit; SSU - kleine Untereinheit, 5.8S-Region angrenzend an die internen transkribierten Spacer-Regionen 1 und 2 (Gaitanis 2009)



Diese ITS-Regionen zeichnen sich weiter durch eine auffallende Vielseitigkeit der Sequenzen sowohl zwischen den Hauptgruppen von eukaryonten Mikroorganismen als auch innerhalb der Spezies derselben Hauptgruppe aus. Die Sequenzgröße variiert zwischen 300 Basenpaaren bei Hefen bis hin zu 1000 Basenpaaren beim Menschen (Gonzalez 1990/Joseph 1999). Um eine Identifikation von *Malassezia*-Hefen anhand der ITS-Region durchführen zu können, muss die zu untersuchende DNA extrahiert, mit Hilfe der entsprechenden Primer vervielfältigt und anschließend sequenziert werden.

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit thematisiert die Evaluation einer in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Gießen entwickelten phänotypischen Differenzierungsmethodik zur Speziesidentifikation von *Malassezia*-Hefen mittels einer molekularbiologischen Referenzmethode.

Die Spezies der Gattung der *Malassezia* besitzen als Teil der physiologischen Hautflora warmblütiger Tierarten und des Menschen Pathogenitätspotenzial von der Dermatoase bis hin zur vital-bedrohlichen Sepsis mit innerhalb der Gattung sich unterscheidender Therapieregime, weshalb der Speziesidentifikation entsprechende Bedeutung zukommt. Des Weiteren wird die Speziesdifferenzierung der Gattung *Malassezia* auch für phylogenetische Studien genutzt.

Prinzipiell kann eine Identifizierung von *Malassezia*-Spezies mittels konventioneller Methoden wie auch molekularbiologischer Methoden erfolgen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit diesen Differenzierungsmöglichkeiten. Es werden konventionelle und molekularbiologische Techniken gegenübergestellt und diskutiert, welche Verfahren für die Differenzierung geeignet sind. Evaluiert wird eine am UKGM durch Gutsuz et al. entwickelte phänotypische Differenzierungsmethodik von *Malassezia*-Hefen mit Modifikation der auf der Methodik von Guého und Guillot basierenden Fettsäureauxanographie als Teil eines Testsystems zur *Malassezia*-Differenzierung. Dies geschieht anhand der Bestimmung der Übereinstimmungsrate mit der bereits etablierten molekularbiologischen ITS1-rDNA-Sequenzierung nach Makimura et al. (Makimura et al. 2000). Bei den ITS-Regionen handelt es sich um zwei der meist genutzten DNA-Abschnitte für die umfassende Typisierung der *Malassezia*-Spezies (Gaitanis 2009).

Als konkrete Fragestellung sollte beantwortet werden:

Stellt die modifizierte Fettsäureauxanografie nach Gutsuz et al. in Ergänzung zu weiteren konventionellen Verfahren als phänotypische Differenzierungsmethodik eine praktikable und im Vergleich zur molekularbiologischen ITS1-rDNA-Sequenzierung nach Makimura et al. (2000) eine ausreichend zuverlässige Methode zur *Malassezia*-Speziesidentifikation dar?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Referenzstämme

Es wurden verschiedene, bereits vor der Methoden-Testung in der Identität bekannte Referenzstämme unterschiedlicher *Malassezia*-Spezies sowohl durch die phänotypische Differenzierungsmethodik als auch molekularbiologisch mit Hilfe der ITS1-rDNA-Sequenzierung bestimmt. Hiermit kann ermittelt werden, wie valide die Test- und die Referenzmethode sind. Die *Malassezia*-Referenzstämme sind in der folgenden Tabelle mit der Bezeichnung der Proben, der Speziesbenennung sowie der ursprünglichen Herkunft der Proben dargestellt.

Tabelle 4: *Malassezia*-Referenzstämme

Bezeichnung/Stamm	Spezies	Herkunft
CBS 1878 T	<i>M. furfur</i>	Kopfschuppen
CBS 4170	<i>M. furfur</i>	Ohr eines Pferdes
CBS 4171	<i>M. furfur</i>	Ohr einer Kuh
CBS 6000	<i>M. furfur</i>	Kopfschuppen
CBS 6046	<i>M. furfur</i>	Pityriasis versicolor
EG 658*	<i>M. furfur</i>	Sepsis bei Leukämie
CBS 4162	<i>M. furfur</i>	Ohr eines Schweines
CBS 7019	<i>M. furfur</i>	Pityriasis versicolor
CBS 7222 T	<i>M. sympodialis</i>	Ohr eines AIDS-Patienten
CBS 7979	<i>M. sympodialis</i>	klinisch unveränderte Haut
CBS 7877 T	<i>M. restricta</i>	klinisch unveränderte Haut
CBS 7861	<i>M. slooffiae</i>	nicht bekannt
CBS 9145	<i>M. dermatis</i>	nicht bekannt
CBS 7876	<i>M. obtusa</i>	klinisch unveränderte Haut
CBS 7966	<i>M. globosa</i>	Pityriasis versicolor
CBS ATCC 42132	<i>M. sympodialis</i>	nicht bekannt
CBS 1892	<i>M. pachydermatis</i>	Ohr eines Hundes

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands; *: Geschenk von Dr. Guého, Institut Pasteur, Paris, France; T: type-strain; NT: Neotype-strain;

3.1.2 Wildstämme

Die Wildstämme wurden mit Hilfe von Kopfmassagebürsten (WEKA, Dortmund, FRG) aus Kunststoff von sowohl gesunder als auch kranker Haut gewonnen. Die Identität der *Malassezia*-Spezies war zuvor nicht bekannt. Die genaue Verarbeitung des gewonnenen biologischen Materials wird im folgenden Methoden-Abschnitt beschrieben. Weitere Wildstämme wurden aus den Beständen des mykologischen Labors der Hautklinik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, übernommen.

3.1.3 Geräte, Materialien, Chemikalien

3.1.3.1. Geräte

- 1) Kopfmassagebürsten (WEKA, Dortmund, FRG)
- 2) sterile Cups (Fa. Eppendorf Größe 2,0;1,5;0,5)
- 3) sterile Pipettenspitzen blau, weiß, gelb (Fa. Eppendorf)
- 4) Zentrifuge (Fa. Eppendorf, 5415D)
- 5) Vortexer (Fa. Bender und Hobein, Vortexgenie)
- 6) Thermoerhitzer (Fa. Eppendorf, Mixer Comfort, 2ml)
- 7) Thermocycler (Fa. Eppendorf, Mastercycler gradient, Inv Nr.: 1086804 00/90)
- 8) Laufkammer (Fa. Life Technologies, Horizon 20.25, Cat Nr.: 21069-018)
- 9) Elektrophorese (Fa. Biometra, Whatman, PS 305T)
- 10) UV-Tisch (TFX-35LC, Serial No.: 0410832)
- 11) Digitalkamera (Fa. Cannon)
- 12) PC (Max Data)
- 13) Brutschrank (Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau)
- 14) Gelkammer für die Gelelektrophorese (Fa. Bächler Fein Tech M.A.K.I Hölstein)
- 15) Mikrowelle (z.B. Amica MW 13151)
- 16) sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Fa. Nunc, Roskilde, DK)
- 17) UV-Abdeckschutz (Fa. Biometra, BDA Digital)

3.1.3.2 Chemikalien und Materialien

3.1.3.2.1 (m)-Dixon Agar

- 1) 3,6 % Malzextrakt (Malzextrakt-Bouillon, Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
- 2) 0,6 % Pepton (Casein) (Pepton aus Casein, Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
- 3) 2,0 % Ochsen-galle (Fa. Merck Darmstadt, FRG)
- 4) 1,0 % Tween[®] 40 (Tween[®] 40 Atlas, Fa. Sigma, St. Louis, USA)
- 5) 0,4 % Olivenöl (aus der Apotheke kaltsterilisiert)

- 6) 1,2 % Agar (Agar Agar reinst, Fa. Merck)
- 7) 0,04 % Cycloheximid (Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, FRG)
- 8) 0,005 % Chloramphenicol (Fa. Merck, Darmstadt, FRG)

3.1.3.2.2 Leeming-Notman-Agar

- 1) 2 g Pepton (Pepton aus Casein, Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
- 2) 2 g Glucose (D(+)-Glucose wasserfrei, Fa. Merck)
- 3) 0,4 g Hefeextrakt (Fa. Dicfo, Detroit, USA)
- 4) 1,6 g Ochsen-galle (Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
- 5) 2 ml Glycerol (Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
- 6) 0,1 g Glycerol-Monostearat (BDH, England)
- 7) 3 g Agar (Agar Agar reinst, Fa. Merck, Darmstadt)

3.1.3.2.3 Gelelektrophorese

- 1) TE-Puffer: 1 l Aqua dest. 1,21 g TRIS und 0,37 g EDTA
- 2) TBE-Puffer: Stammlösung mit 108 g (89 mM) TRIS-Puffer, 55 g (89 mM) Borsäure und 186,1 g (0,5 M) EDTA-Na₂ x 2 H₂O in 1000 ml Aqua dest (Lichrosolv)
- 3) Agarosegel 1 % ig: 2,5 g Agar, 250 ml 1:10 verdünnter TBE 10 mal-Puffer, Ethidiumbromid-Lösung: 5 µl (10 mg/ml)
- 4) DNA-Leiter : 20 µl der DNA-Leiter (Fa. Invitrogen, Cat. No. 10787-018, Size: 250 µg, Konzentration 1 µg/µl), 100 µl 25 %-iges Ficoll, 240 µl H₂O Auftragspuffer (400 µl 25 %-iger Ficoll-Lösung, versetzt mit Spatelspitze Bromphenolblau), 40 µl TE-Puffer
- 5) 2. 600 µl H₂O

3.1.3.2.4 DNA-Extraktion

- 1) QIAamp DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Catalog no. 51304): 180 µl ATL-Puffer, µl 20 Proteinase K, 200 µl AL-Puffer, 500 µl AW1-Puffer, 500 µl AW2-Puffer, QIAamp-Spinsäulen mit 2 ml Sammelröhrchen
- 2) 100 µl Aqua dest. (Fa. Merck, Lichrosolv-Wasser für Chromatographie)
- 3) 200 µl Ethanol (96% unvergällt)

3.1.3.2.5 PCR

- 1) 1662 µl Wasser für die Chromatographie (Fa. Merck, Lichrosolv-Wasser für Chromatographie)
- 2) 200 µl PCR-Puffer (Fa. Invitrogen, Cat. No. 10342-053)

- 3) 6 µl Primer 18SF1: 5`-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-`3 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 4) 6 µl Primer 58SR1: 5`-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-`3 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 5) d` NTPs mit 4 µl d` ATP, 4 µl d` CTP, 4 µl d` GTP und 4 µl d` TTP (Fa. Invitrogen, Cat. No. 18427-013)
- 6) 10 µl Taq-Polymerase (Fa. Invitrogen, Cat. No. 10342-053)
- 7) DNA-Template

3.1.3.2.6 Auxanografie-Testsystem mit u.a. modifizierten Fettsäureauxanogramm von Gutsuz et al.

- 1) Eskulinagar: 5,37 g Eskulin (Galle-Eskulin-Azid-Agar, Sifin, Berlin, BRD) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt
- 2) Pigment-induzierender 1b-Agar: 5,37 g Eskulin (Galle-Eskulin-Azid-Agar, Fa Sifin, Berlin, BRD) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt, 3 ml Tween[®] 80 (Tween[®] 80 Atlas, Fa Sigma, St. Louis, USA) und 0,3 g L-Tryptophan (L-Tryptophan, Fluka, Buchs, Schweiz)
- 3) Cremophor EL[®]-Agar: Je 1,65 g Selektivagar für pathogene Pilze (Fa Merck, Darmstadt, FRG), Aqua dest. auf 100 ml, 4 ml Cremophor EL[®] (Fa Fluka, Buchs, Schweiz).
- 4) Fettsäure-Agar: Je 3,3 g Selektivagar für pathogene Pilze, Aqua dest. auf 100 ml, jeweils 1 g der in folgender Tabelle aufgeführten Fettsäuren, Emulgator: Eigelblösung (Eigelb eines handelsüblichen Hühnereis mit 0,9 %iger isotoner Kochsalzlösung (Fa Braun, Melsungen))
- 5) Selektivagar für pathogene Pilze (Fa Merck, Darmstadt)
- 6) (m)-Dixon-Agar: siehe Punkt 3.1.3.2.1

Tabelle 5 verwendete Fettsäuren mit Angabe der Kohlenstoff-Kettenlängen, der Bezeichnung und der Herstellerfirma

Kohlenstoffkettenlängen	Bezeichnung	Bezug über
C 10:0	Caprinsäure	Sigma, St. Louis, USA
C 12:0	Laurinsäure	Sigma, St. Louis, USA
C 14:0	Myristinsäure	Sigma, St. Louis, USA
C 16:0	Palmitinsäure	Merck, Hohenbrunn, BRD
C 18:0	Stearinsäure	Sigma, St. Louis, USA
C 18:1; cis 9	Ölsäure	Sigma, St. Louis, USA
C 18:2; cis 9,12	Linolsäure	Sigma, St. Louis, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht der *Malassezia*-Stämme

Um die Wildstämme entnehmen zu können, wurden Kopfmassagebürsten (WEKA, Dortmund, FRG) aus Kunststoff verwendet. Direkt nach dem Bürsten erfolgte die Inokulation der biologischen Proben in Agarschalen. Hierbei handelte es sich um sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Fa Nunc, Roskilde, DK). Die verschiedenen Proben wurden dabei sowohl in Agarschalen mit Leeming-Notman-Agar als auch in Agarschalen mit (m)-Dixon-Agar gegeben. Andere Wildstämme wurden aus den Beständen des mykologischen Labors der Hautklinik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, übernommen. Um sicherzustellen, dass es sich nicht um Misch-, sondern um reine Kulturen handelte, wurden alle Stämme mäanderförmig ausgestrichen und, sobald eine einzelne punktförmige Kolonie zu erkennen war, diese auf einen frischen Nährboden verimpft. Alle Stämme wurden auf einem modifizierten (m)-Dixon-Agar (Gueho 1996) bei 32 °C in einem Brutschrank (Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau) angezüchtet und für die Dauerkultur in wöchentlichen Abständen auf frisch zubereitete Nährböden weiterverimpft. Das Wachstum dauerte zwischen drei und vier Tagen, anschließend wurde mit einer sterilen 2 ml Öse eine reiskorngroße Probe abgeerntet und dieses Material zur DNA-Gewinnung weiterverwertet. Die verwendeten Referenzstämme wurden beim CBS (Centraalbureau voor Schimmel-cultures, Baarn, Niederlande) bestellt. Diese empfehlen die Stämme zunächst auf einem modifiziertem Leeming-Notman-Agar (MLNA) zu geben. Aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit wurden die Referenzstämme zusätzlich auf einem (m)-Dixon-Agar subkultiviert.

3.2.1.1 modifizierter (m)-Dixon-Agar

Alle Stämme wurden auf einem modifizierten (m)-Dixon-Agar angezüchtet.

Zusammensetzung des verwandten (m)-Dixon-Agars (Mayser 1999):

3,6 % Malzextrakt	(Malzextrakt-Bouillon, Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
0,6 % Pepton (Casein)	(Pepton aus Casein, Fa. Merck, Darmstadt, FRG)
2,0 % Ochsengalle	(Fa. Merck Darmstadt, FRG)
1,0 % Tween 40	(Tween 40 Atlas, Fa. Sigma, St. Louis, USA)
0,4 % Olivenöl	(aus der Apotheke kaltsterilisiert)
1,2 % Agar	(Agar Agar reinst, Fa. Merck)
0,04 % Cycloheximid	(Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, FRG)
0,005 % Chloramphenicol	(Fa. Merck, Darmstadt, FRG)

Zur Herstellung von 250 ml des Nährbodens wurden

9 g Malzextrakt,

1,5 g Pepton,

5 g Ochsen-galle,

5 g Agar,

0,1 g Cycloheximid und

2 ml einer Chloramphenicol-Stammlösung**

abgewogen und mit Aqua dest. ad 250 ml aufgefüllt.

** Die Stammlösung besteht aus: 6,25 mg Chloramphenicol/ml H₂O und wurde sterilfiltriert abgefüllt und bei - 20 °C gelagert; 2 ml der Stammlösung wurden zugegeben.

Nach 30minütigem Autoklavieren bei 1 bar in einem Melag-Autoklaven Typ 23 (Fa. Melag, Berlin, FRG) und Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 2,5 ml Tween[®] 40 und 1 ml Olivenöl hinzugefügt.

Jeweils 15 ml des Mediums wurden unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Fa. Nunc, Roskilde, DK) gegossen.

3.2.1.2 (m)-Leeming-Notman-Agar

Für 200 ml eines modifizierten Leeming-Notman-Agars wurden

2 g Pepton (Pepton aus Casein, Fa. Merck, Darmstadt, FRG),

2 g Glucose (D(+)-Glucose wasserfrei, Fa. Merck),

0,4 g Hefeextrakt (Fa. Dicfo, Detroit, USA),

1,6 g Ochsen-galle (Fa. Merck, Darmstadt, FRG),

2 ml Glycerol (Fa. Merck, Darmstadt, FRG),

0,1 g Glycerol-monostearat (BDH, England) und

3 g Agar (Agar Agar reinst, Fa. Merck, Darmstadt)

abgewogen und mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt.

Erst wird das Gemisch 30 min bei 1 bar in einem Melag Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG, Autoklave Typ 23) autoklaviert. Anschließend lässt man es auf ca. 50 °C abkühlen, gibt 5 ml Tween[®] 60 (Tween[®] 60 Atlas, Sigma, St. Louis, USA) und 20 ml Olivenöl hinzu. Dann gießt man 15 ml des Mediums unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, DK).

3.2.2 Gelelektrophorese

Für die Herstellung des für die Gelelektrophorese benötigten, 1:10 verdünnten 10* TBE-Puffers wird eine Stammlösung mit 108 g (89 mM) TRIS-Puffer, 55 g (89 mM) Borsäure und 186,1 g (0,5 M) EDTA- $\text{Na}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml Aqua dest (Lichrosolv) hergestellt. Das Endprodukt wird anschließend mit Hilfe von HCl- bzw. NaOH-Titration auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt.

„TBE“ ist die Abkürzung für TRIS-Borat-EDTA, also die jeweiligen Komponenten im Puffergemisch. Es ist ein basischer Puffer mit der Eigenschaft, die DNA in ihrer deprotonierten, anionischen Form zu erhalten und den Zerfall der DNA mittels Deaktivierung von DNAsen durch die Chelat-bildende Funktion von EDTA mit Magnesiumbindung partiell zu verhindern. Die ionische Lösung ist Strom leitend.

Um die für die bei der Gelelektrophorese eingesetzten DNA-Leiter notwendigen TE-Puffer herzustellen, werden 10 mM TRIS ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, MG: 121,1 g) und 1 mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, MG: 372,24 g, pH = 8) benötigt. Dazu werden in einem Liter Aqua dest. 1,21 g TRIS und 0,37 g EDTA gelöst und mittels HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 8 titriert. Danach wird der Puffer bei einem Druck von 1 bar über einen Zeitraum von 30 min (Fa Melag, Berlin, FRG, Autoklave Typ 23) autoklaviert.

„TE“ im Terminus TE-Puffer steht als Akronym für TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, MG 121,14) und EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, MG 292,24). TE-Puffer ist ein häufig verwendeter Puffer zum Lösen und Lagern von u.a. Oligonukleotiden, da Nukleinsäuren in diesem Puffer vor Degradation weitgehend geschützt sind, da EDTA Magnesiumionen komplexiert, die als Kofaktoren für degradierende Endonukleasen agieren. Beim einzustellenden pH-Wert von 8 zeigen die Endonukleasen die geringste degradierende Aktivität.

3.2.3 DNA-Extraktion

Unter einer DNA-Extraktion ist deskriptiv das Herauslösen von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus seiner originären Umgebung zu verstehen. Diese erfolgte in der vorliegenden Arbeit bei den Zellen der *Malassezia*-Hefen mit Hilfe des „QIAamp DNA Mini Kit“ der Firma Qiagen. Der Kitinhalt umfasst verschiedene Komponenten: Proteinase K, QIAamp-Spinsäulen, 2 ml Sammelröhrchen („Collection tubes“ – „C-Tube“) und fünf verschiedene Puffer (ATL, AL, AW1, AW2, AE).

Die komplexe Protokoll-basierte Prozedur der DNA-Extraktion mittels QIAamp DNA Mini Kit kann abstrahierend in Vorbereitungsschritte und eigentlicher DNA-Extraktion mit den

Teilschritten der Zytolyse, der DNA-Adsorption an die Silicagel-Oberfläche der Chromatographiesäule, der DNA-Purifizierung an der Chromatographiesäule, der DNA-Elution von der Chromatographiesäule, der DNA-Fällungsreaktion mittels hochkonzentriertem Ethanol sowie der Transfer des DNA-Pellets in Aqua dest-Lösung in ein Eppendorfcup substrukturiert werden.

Als Vorbereitung müssen vor Beginn der eigentlichen DNA-Extraktionsschritte alle Proben und Testbestandteile auf Raumtemperatur äquilibriert werden. Zwei Wasserbäder sind auf 56°C bzw. 70°C zu temperieren.

Den ersten Schritt zur DNA-Extraktion stellt die Lyse der Zellen mittels sequenzieller Zugabe von ATL-Puffer und Proteinase K dar. ATL-Puffer ist ein Gewebslysepuffer, dessen inhaltliche Zusammensetzung Hersteller-seitig nicht angegeben wird. Die hochreaktive, umgebungsstabile Proteinase K ist ein Enzym aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album*, die zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen mit einer „active-site catalytic Triade“ (Asp³⁹-His⁶⁹-Ser²²⁴) gehört und als Endo- wie Exopeptidase wirkt. Proteinase K besitzt ein breites Substratspektrum, da die Erkennung von Substraten hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat erfolgt (Müller et al. 1994). Das Enzym besitzt zwei Bindungsstellen für Kalzium-Ionen, deren Bindung die molekulare Stabilität verbessert, aber keinen wesentlichen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt. Dadurch kann Proteinase K auch in Anwesenheit von Kalzium- und Magnesium-komplexierender EDTA katalytisch wirken – im Gegensatz zu DNA-katabolisierenden Nukleasen. Proteinase K ist über einen weiten pH-Bereich von 4 bis 12 stabil mit einem pH-Optimum von 8 (Ebeling et al. 1974). In der Anwesenheit von 0.1-0.5 % SDS (Natriumlaurylsulfat, Natriumdodecylsulfat = anionisches Tensid/Detergens), 3 M Guanidiniumchlorid, 1 M Guanidiniumzyanat wie 4 M Harnstoff behält die Proteinase K ihre Aktivität und schlüsselt die Unterschiedlichkeit der Proteine und Nukleasen in der DNA-Aufbereitung auf, ohne die Intaktheit der isolierten DNA zu kompromittieren. Eine Anhebung der Reaktionstemperatur von 37 °C auf 50–60 °C kann die Enzymaktivität deutlich erhöhen (en.wikipedia 2014).

Das nach der Zytolyse resultierende Lysat wird nach Zugabe von AL-Puffer, der die DNA-fällenden Pufferbedingungen für den nachfolgenden Schritt der DNA-Adsorption an eine Kieselgelmembran optimieren soll, auf die QIAamp-Spinsäule gegeben, an deren Silicagel-Oberfläche die DNA durch polare Wechselwirkungen adsorbiert. Das an die QIAamp-Membran gebundene polare Biopolymer DNA wird dann in zwei Zentrifugationsschritten zur DNA-Purifizierung mittels Waschpuffer von verbliebenen Kontaminanten gereinigt. Dazu

werden zwei unterschiedliche Waschpuffer – „Buffer AW1“ und „Buffer AW2“ – verwendet, um so den Reinheitsgrad der später von der Chromatographiesäule zu eluierenden DNA zu steigern. Die beiden Waschschritte entfernen verbliebene Kontaminanten, ohne die DNA-Bindung an die QIAamp-Membran zu beeinflussen. Die Waschpuffer enthalten Chaotrope, d.h. chemische Substanzen, die geordnete Wasserstoffbrückenbindungen stören, um die in der Chromatographiesäule enthaltene Matrix von verunreinigenden DNA-bindenden Proteinen zu bereinigen. Die chaotropen Salze denaturieren die Eiweiße und halten sie in Lösung, während die DNA an die Matrix gebunden bleibt (Borodina et al. 2003).

Die so gereinigte DNA wird anschließend in konzentrierter Form mit dem auf Raumtemperatur äquilibrierten Elutionspuffer „Buffer AE“ von der QIAamp-Spinsäule eluiert. Die DNA-Ausbeute wird gesteigert, in dem man die QIAamp Spinsäule mit „Buffer AE“ für 5 min vor der Zentrifugation bei Raumtemperatur stehen lässt. Die eluierte genomische DNA kann direkt in einer PCR eingesetzt werden. Falls die gereinigte DNA gelagert werden soll, empfiehlt es sich, die DNA mit Buffer AE (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) zu eluieren und bei –20 °C aufzubewahren. In wässriger Lösung gelagerte DNA unterliegt der sauren Hydrolyse. Die Zusammensetzung des AE wird vom Hersteller Qiagen nicht angegeben. In der Literatur beschrieben erfolgt die Elution der DNA von der Matrix in anderen Untersuchungen durch Zugabe von Wasser oder leicht basischem Tris-Puffer mit EDTA-Zusatz (TE-Puffer) [Wikipedia].

Danach erfolgte als nächster Schritt der DNA-Extraktion die Fällungsreaktion mit hochkonzentriertem Ethanol in Lösung. Hier wird die DNA unter leicht aziden Bedingungen (pH 5,2) in einer weniger polaren Umgebung aufgrund der Verringerung der Löslichkeit ausgefällt (Zeugin et al. 1985). Wasser besitzt eine Dielektrizitätskonstante von 80,1 bei 25 °C, während diejenige von Ethanol bei nur etwa 24,3 liegt. Der niedrige pH-Wert bei der Ethanolfällung wird durch die Zugabe von saurer Kaliumacetat- oder Natriumacetat-Lösung erzielt. Dies hält die sonst negativ geladene DNA in einem protonierten und ungeladenen Zustand, wodurch die Löslichkeit weiter gesenkt wird. Da die Ethanolfällung relativ unsauber trennt und einige Proteine, Polysaccharide und RNA gleichzeitig mit der DNA präzipitieren, wird sie meist nur als abschließender Reinigungsschritt an einer Probe eingesetzt [Wikipedia]. DNA ist ein polares Biopolymer mit relativ hohem Molekulargewicht, weshalb sie in unpolarer Umgebung durch die verkleinerte Hydrathülle und die daraus folgende Absenkung ihrer Löslichkeit ausfällt. Daneben ist DNA aufgrund des Desoxyribosephosphat-Rückgrates mit anionischen Ladungen proportional zur Kettenlänge in sauren, wässrigen Lösungen unlöslich. Bei niedrigen pH-Werten sind die Phosphatgruppen und somit die negativen

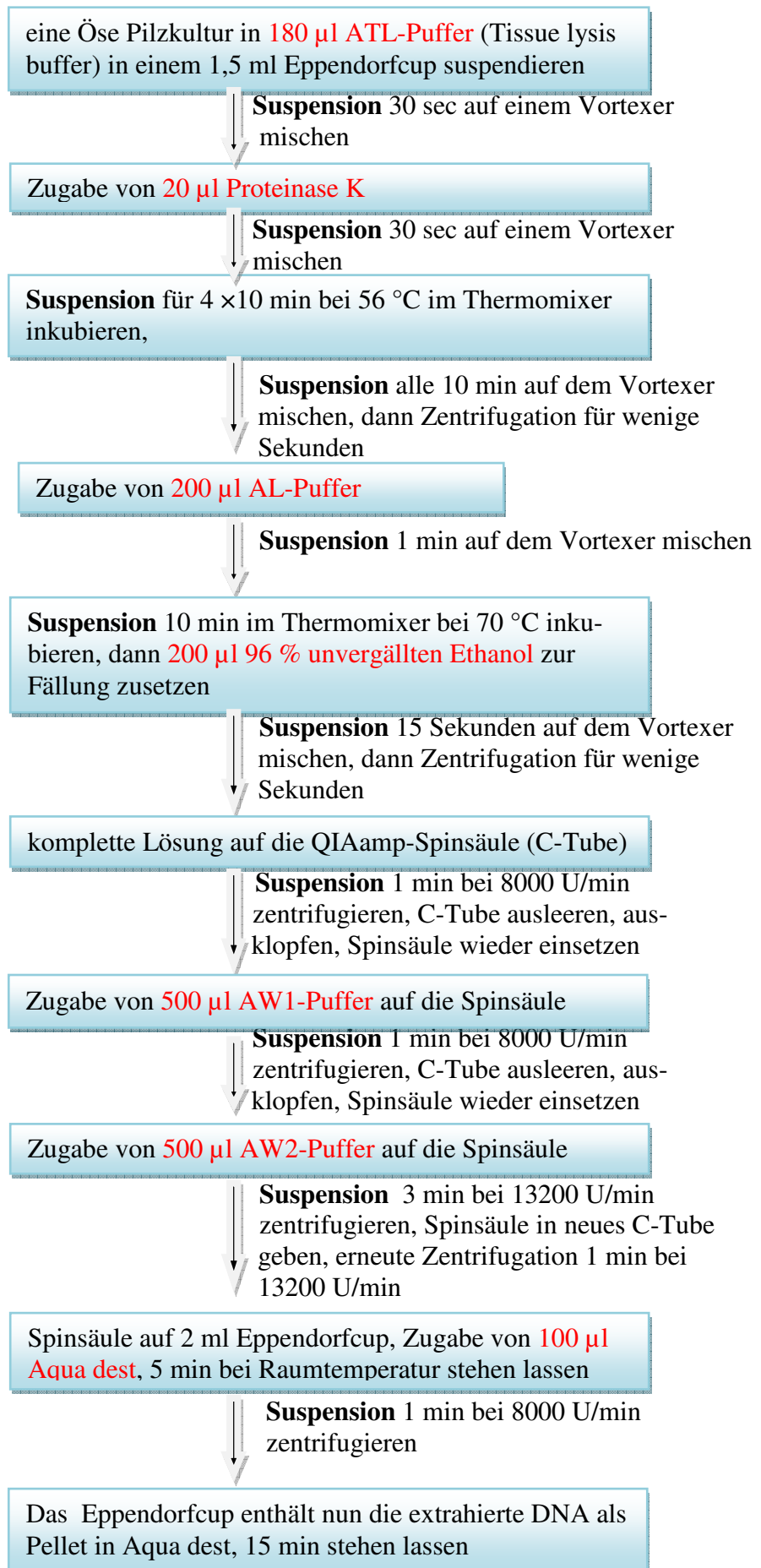
Ladungen der DNA mit Protonen abgesättigt, wodurch die Hydrathülle sich ebenfalls verkleinert. [Wikipedia].

Der letzte Schritt der DNA-Extraktion ist die Zugabe von destilliertem Wasser über einem Eppendorfcup, in dem sich das DNA-Pellet in Lösung hält.

Im Detail erfolgte die DNA-Extraktion analog dem „Tissue Protocol (QIAamp DNA Mini Kit only)“ der Firma Qiagen, allerdings unter Abwandlung der Lysebedingungen wie folgt:

Unter sterilen Bedingungen wird eine Öse einer *Malassezia*-Kultur in ein mit 180 µl ATL-Lyse-Puffer zur Suspension angereichertes 1,5 ml Eppendorfcup gegeben. Die Suspension wird 30 Sekunden lang gevortext. Anschließend werden 20 µl Proteinase K mit einer Enzymaktivität von 600 mU/ml hinzu pipettiert. Zur Homogenisierung der Probe erfolgt eine 30 Sekunden lange Behandlung auf einem Vortexer mit anschließender 30-minütiger Inkubation in einem Wasserbad bei 56 °C, wobei alle 10 Minuten eine kurzfristige Probenentfernung zum jeweils 15-sekündigen Mischen auf dem Vortexer durchgeführt wird. Als nächster Schritt erfolgt ein Zentrifugieren der Probe bis auf 8000 U/min. Es werden 200 µl AL-Puffer zugegeben, 60 Sekunden auf dem Vortexer gemischt und dann die Probe für 10 Minuten in einem 70 °C warmen Wasserbad (Thermomixer) inkubiert. Danach werden 200 µl unvergällte 96%-ige Ethanol-Lösung hinzu pipettiert. Anschließend wird die Probe 15 Sekunden auf den Vortexer gegeben und daraufhin kurz anzentrifugiert. Die Lösung wird nach diesem Schritt in eine QIAamp-Spinsäule, welche sich in einem Probensammelröhrchen (C-Tube) befindet, gegeben und eine Minute mit 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Probensammelröhrchen wird ausgeleert, ausgeklopft und die QIAamp-Spinsäule mit dem Präzipitat erneut eingesetzt. Anschließend werden 500 µl des AW1-Puffers auf die QIAamp-Spinsäule appliziert. Die Lösung kommt ebenfalls für eine Minute bei 8000 Umdrehungen in die Zentrifuge, das Probensammelröhrchen wird nochmals geleert, ausgeklopft, die Spinsäule erneut eingesetzt und dann mit 500 µl AW2-Puffer suspendiert. Die Probe wird anschließend bei 13200 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten in die Zentrifuge gegeben, das Probensammelröhrchen in diesem Schritt durch ein Neues ersetzt, in welches die QIAamp-Spinsäule mit dem Präzipitat eingesetzt und eine weitere Minute bei 13200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wird. Die QIAamp-Spinsäule wird dann auf ein 2 ml Eppendorfcup als Auffanggefäß gesetzt, mit 100 µl Aqua dest. suspendiert und bei 8000 Umdrehungen eine Minute zentrifugiert. Die sich nun im 2 ml Eppendorfcup befindende DNA wird 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das auf der folgenden Seite abgebildete Flussdiagramm veranschaulicht die beschriebene komplexe Prozedur in einem übersichtlichen Schema.

Grafik 2: Flußdiagramm zur DNA-Extraktion



3.2.4 PCR

Die PCR erfolgte wie bei Makimura et al. 1998 beschrieben: Als Primer dienten die von Makimura et al. hergestellten Oligonukleotide 18SF1: 5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-'3 und 58SR1: 5'TTCGCTGCGTTCTTCATCGA'3 (Makimura 1998).

Jeder PCR-Ansatz enthielt:

5 µl der Lösung mit dem jeweiligen DNA-Template

10 µl des 10*PCR-Puffers (Fa Invitrogen)

100 µM von jeweils d`ATP, d`CTP, d`GTP und d`TTP

2,5 U Taq-Polymerase

30 pmol der beiden Primer

sowie Wasser für die Chromatographie, um ein Endvolumen von 100 µl PCR-Ansatz zu erzielen. Jede 100 µl Ansatz enthalten 2 µl PCR-Template. PCR-Puffer, Wasser für die Chromatographie, Primer, dNTPs sowie die Taq-Polymerase wurden jeweils für 20 PCR-Ansätze angesetzt. Die Herstellung erfolgte nach folgender Sequenz:

1. 1662 µl Wasser für die Chromatographie
2. 200 µl PCR-Puffer
3. 6 µl Primer F s.o.
4. 6 µl Primer R
5. 4 µl der 4 d` NTPs (d.h. 4 µl d`ATP, 4 µl d`CTP, 4 µl d`GTP und 4 µl d`TTP)
6. 10 µl Taq-Polymerase

Diese wurden anschließend in 2 ml autoklavierten Eppendorfcups auf Eis angesetzt. Jeweils 95 µl des Master-Mixes wurden zu 5 µl der Lösung mit dem jeweiligen DNA-Template gegeben. Die PCR erfolgte in drei Schritten:

1. Denaturierung:

Hierbei wird die doppelsträngige DNA eine Minute lang auf 94 °C erhitzt. Die beiden Stränge werden voneinander getrennt, in dem die Wasserstoffbrückenbindungen durch thermolytische Spaltung aufbrechen. Als Besonderheit erfolgt im ersten Zyklus anstatt der beschriebenen Denaturierung einmalig die Initialisierung. Hier wird die DNA oft für einen längeren Zeitraum erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen. Die DNA wird hierzu 5 Minuten auf 94 °C erhitzt, um die Stränge von DNA und Primer vollständig zu trennen.

2. Primerhybridisierung:

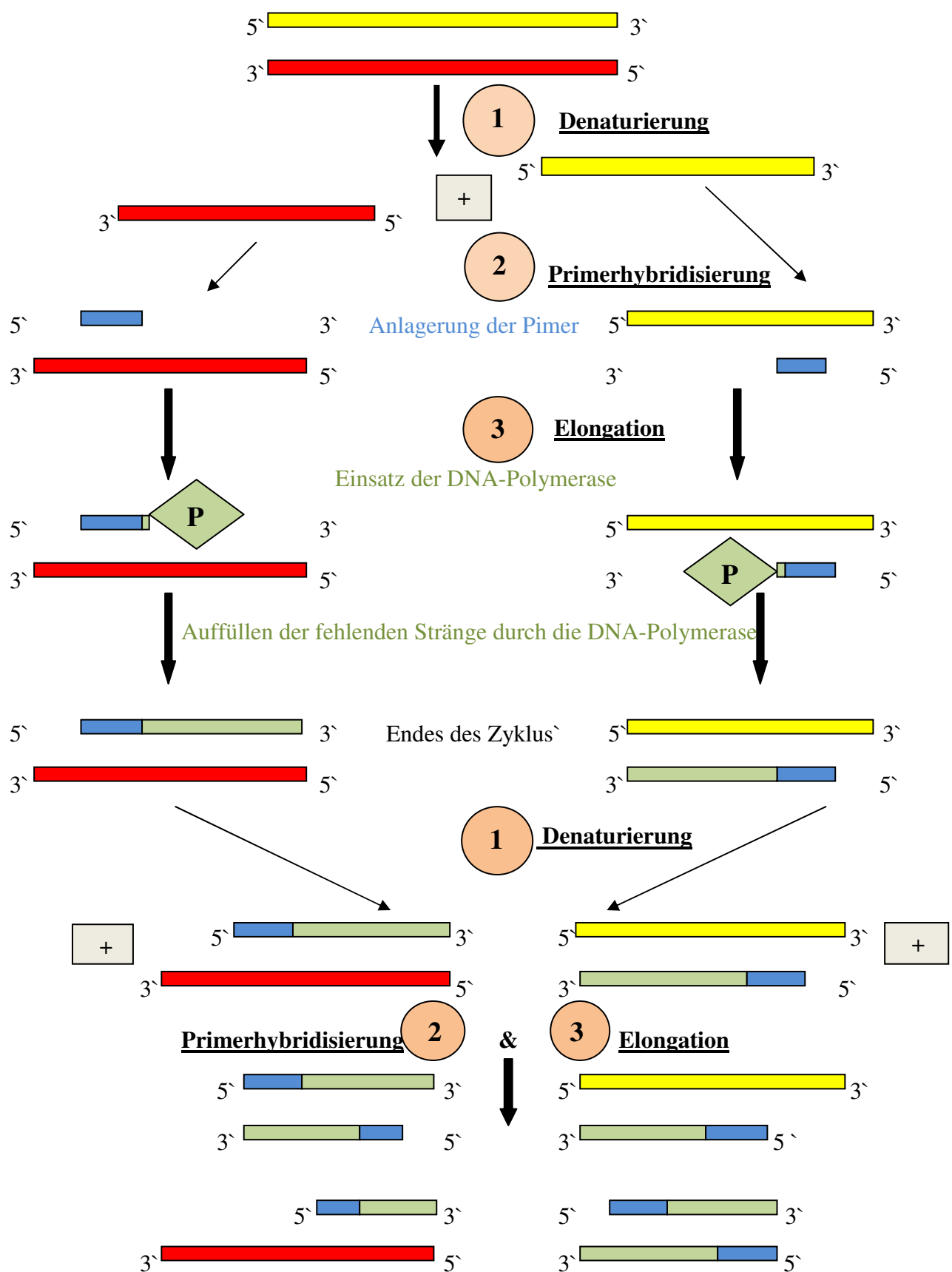
Sind die Stränge getrennt, kommt es zu einer Temperatursenkung auf 55 °C für 15 sec. Jetzt können sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern. Diese Temperatursenkung

hängt von den spezifischen Primern ab und sollte deren Schmelzpunkt um 2-3 °C unterschreiten. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, kann es dazu führen, dass sich die Primer nicht anlagern, wird sie zu niedrig gewählt, lagern sie sich an den falschen Stellen an.

3. Elongation:

Nun wird die Temperatur für weitere 15 sec auf 72 °C erhöht und die DNA-Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit den freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und arbeitet dann entlang des DNA-Stranges. Länge und Zeit dieses Schrittes richten sich nach der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes. Im ersten Zyklus entstehen pro DNA-Ausgangsdoppelstrang zwei DNA-Stränge, welche im Bereich der Zielsequenz doppelsträngig sind. Nach dem Schmelzen am Anfang des zweiten Zyklus stehen dadurch die beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge und zwei am 3'-Ende überlange Einzelstränge zur Verfügung. Dies ist dadurch zu erklären, dass lediglich ein Startpunkt (Primer), nicht aber ein Endpunkt exakt festgelegt ist. Der Abbruch der Strangsynthese erfolgt dabei spätestens durch die Strangtrennung im folgenden Denaturierungsschritt. Im zweiten Zyklus stehen die ursprünglich eingesetzte DNA sowie die gerade gebildeten DNA-Stränge zur Verfügung. An der ursprünglichen DNA erfolgt der gleiche Prozess wie im ersten Zyklus. An die neu gebildeten DNA-Einzelstränge, welche am 3'-Ende bereits dort terminieren, wo sie enden sollen, lagern sich nun wieder Primer in der 3'-Region an. Die nun gebildeten Stränge haben auch keinen 3'-Überhang, da das Template am 5' Ende bereits richtig endet (durch den ersten Syntheszyklus und den ersten Primer). Am Ende des zweiten Zyklus stehen damit erstmals unmittelbar Produkte der gewünschten Länge zur Verfügung. In den folgenden Zyklen vermehren sich die gewünschten Produkte exponentiell (da sie selbst als Matrize für weitere Strangsynthesen dienen), während die ungewünschten langen Produkte (siehe Produkte des ersten Zyklus) nur linear ansteigen (nur eingesetzte DNA dient als Matrize). Dies ist der theoretische Idealfall; in der Praxis fallen zudem in geringem Maße auch kürzere Fragmente als die gewünschte Ziel-DNA an. Diese kurzen Fragmente häufen sich vor allem in den späten Zyklen an, wodurch meist nur etwa 30 Zyklen durchlaufen werden, um insgesamt vorwiegend DNA der gewünschten Länge und Sequenz zu erhalten. Folgend als Grafik die schematische Darstellung der PCR.

Grafik 3: schematische Darstellung der PCR



Fortlaufen des Zyklus mit exponentiellem Anwachsen des kurzen Produktes

Ist dieser Zyklus 35 mal (nach Anleitung der Firma Invitrogen für die verwendete DNA-Taq-Polymerase) abgelaufen, wird die PCR für 10 Minuten auf 72 °C konstant temperiert, um noch eventuell verbliebene Lücken zu füllen, und anschließend auf 4 °C abgekühlt, um die DNA konservieren zu können.

3.2.5 Überprüfung der PCR-Produkte durch Gel-Elektrophorese und Lumineszenz

Verwendet wurden Agarose-Gele. Bei der Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose in glykosidischer Bindung, d.h. chemisch einer Bindung zwischen dem anomeren Kohlenstoffatom eines Kohlenhydrats (Glykon) und dem Hetero- oder selten Kohlenstoffatom eines Aglykons oder einem zweiten Zuckermolekül. Es ist aufgrund seiner Gelierfähigkeit die wichtigste Komponente bei der Herstellung von Gelen und wird in erster Linie aus den Rotalgengattungen Gelidium und Gracillaria gewonnen [Wikipedia „Agar“].

Das Agarosegel wird in der Gelelektrophorese zur elektropherografischen Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen genutzt. Für die Herstellung verwendet man je nach Auftrennungsbereich vorhandener Basenpaarlängen bei Nukleinsäuren unterschiedliche Agarose-Konzentrationen; in der vorliegenden Arbeit 1 %ige Agarose-Gele für den Auftrennungsbereich von 500-10000 bp und auf 1:10 verdünnte TBE 10 mal-Puffer. Aufgrund der Größe der hier verwendeten Gelkammer (Fa Bächler FeinTech M.A.K.I Hölstein) werden 2,5 g Agar mit 250 ml Puffer-Flüssigkeit vermengt. Das Ganze wird durchmischt und in die Mikrowelle für 3 min bei 600 W gegeben. Dem Agar wird nach dem Abkühlen unter dem Abzug 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) beigemengt. Die Flüssigkeit erhält durch die Zugabe eine gelbliche Färbung. Bei Ethidiumbromid (3,8-Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium-bromid, Homidiumbromid) handelt es sich um einen humantoxischen, mutagenen roten organischen Phenanthridin-Farbstoff, der in der Molekularbiologie verwendet wird, um Nukleinsäuren wie DNA und RNA nachzuweisen. Die Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA bzw. RNA. Dadurch wird das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert. Kommt es zu einer Anregung mit ultraviolettem Licht, wird die Lumineszenz der Substanz stark erhöht. Das führt dazu, dass im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell aufleuchten und Nukleinsäure-freie Stellen dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zu der vorliegenden DNA-Konzentration. Dann folgt das Eingießen des Gels in die Gelkammer, welche einen herausnehmbaren durchsichtigen Schlitten enthält, um das fest gewordene Gel transportieren zu können. Entstehen beim Eingießen Luftblasen, müssen diese entfernt werden, da sie den Lauf der DNA-Produkte stören. Weiter werden kurz nach dem

Eingießen zwei Kämme so in das flüssige Gel eingebracht, dass sich nach anschließendem Erhärten des Gels und Entfernen der Kämme sowohl im oberen als auch unteren Bereich zehn Kammern bilden, in die die zu untersuchenden DNA-Produkte hineinpipettiert werden können. Das Gel muss eine Stunde ruhen, damit es fest wird. Das feste Gel wird sodann im durchsichtigen Schlitten in die mit Puffer gefüllte Laufkammer gesetzt. Beim Laufpuffer handelt es sich um ein auf das Zehnfache verdünntes, wie unter 3.2.2 beschriebenes, TBE-Gemisch. Die verwendete Laufkammer fasst ca. 2 l dieses Puffers. Das Gel muss vollständig von Flüssigkeit bedeckt und alle Taschen gefüllt sein, um es vor Austrocknung zu schützen. Weiter benötigt man DNA-Leiter. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus verschiedenen DNA-Strängen unterschiedlicher Länge. Sie wird als Marker bei der Gelelektrophorese verwendet, um sowohl die Größen zu bestimmen als auch die zu untersuchenden DNA-Stränge grob zu quantifizieren. Solch eine Leiter kann zwischen 100 und 10 000 Basenpaaren enthalten. Die unterschiedlichen Leitern haben verschiedene Schwerpunkte. Einige sind besonders für kurze DNA-Fragmente geeignet, andere im Bereich besonders langer. Hier wurde die „1 KB Plus DNA-Leiter“ von Invitrogen verwendet. Sie zeigt besonders im unteren Bereich bei kleinen PCR-Produkten zwischen 200 und 300 Basenpaaren eine gute Ablesbarkeit. Wichtig ist, dass sie tiefgefroren aufbewahrt wird, um eine Reaktion mit DNAsen zu verhindern.

Die DNA-Leiter wird folgendermaßen angesetzt:

1. 20 µl der DNA-Leiter
2. 40 µl TE-Puffer
3. 100 µl 25 %-iges Ficoll
4. 240 µl H₂O

Um das Fortschreiten der Elektrophorese abschätzen zu können, benötigt man einen mit migrationsfähigen Farbstoff versetzten 10 % Glycerol-haltigen Auftragspuffer, der die DNA-Lösung zusätzlich funktionell beschwert, so dass diese nach dem Einfüllen in die Auftragstaschen sinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Der Auftragspuffer enthält als niedermolekularen Farbstoff Bromphenolblau, der im elektrischen Feld mit der DNA in Richtung Anode wandert und so einen Anhaltspunkt für die Migration der DNA gibt.

Dieser wird angesetzt mit:

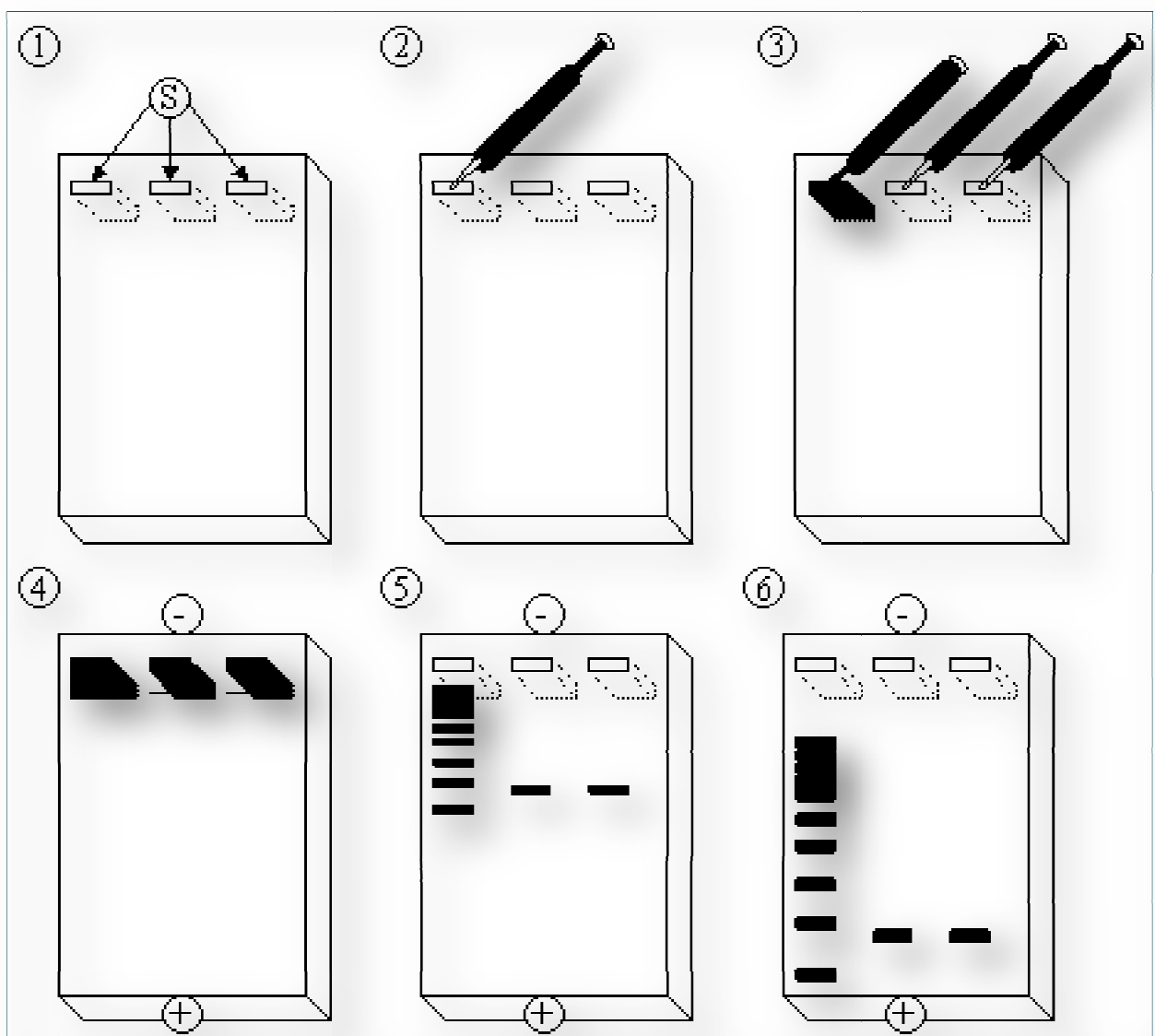
1. 400 µl 25 %-iger Ficoll-Lösung, die mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzt wurde
2. 600 µl H₂O

Schließlich wird die Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, die es ermöglicht, DNA-Stränge nach ihrer Größe zu trennen und sie mit Strängen bekannter Größe, wie die verwendeten DNA-Leiter, zu vergleichen.

Dieses Verfahren funktioniert wie ein Sieb für Moleküle, indem ein elektrisches Feld genutzt wird, um negativ geladene DNA-Moleküle durch die Gelmatrix aus Agarose wandern zu lassen. Kleinere Moleküle sind dabei schneller als größere und somit kommt es zu einer Auftrennung der DNA-Stränge nach ihrer entsprechenden Anzahl von Basenpaaren.

In die Geltaschen wurden jeweils auf beiden Seiten außen die DNA-Leiter mit 10 μ l aufgetragen und in die mittleren Slots die zu analysierende DNA als ein Gemisch von 6 μ l Ficoll-Lösung und 6 μ l PCR-Produkt. Dann legte man die elektrische Spannung mit 100 V bei einer Stromstärke im Milliamperebereich an. Die Elektrophorese benötigte etwa 90 Minuten, um die Stränge aufzutrennen. Folgend ein grafisches Schema der Elektrophorese.

Grafik 4: Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese (Abbildung aus Wikipedia)



1. Slots im Agarosegel
2. Zugabe der DNA-Leiter in den ersten Slot

3. Zugabe der Proben in die übrigen Slots
4. Anlegen der Spannung (die negativ geladene DNA wandert zur positiv geladenen Anode (griech. $\alpha\alpha$ - hinauf, hoch))
5. Kleine DNA-Fragmente wandern schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA ist währenddessen nicht sichtbar. Der Verlauf wird an der Farbfront abgelesen, die sich mit einem DNA-Fragment bestimmter Länge auf gleicher Höhe durch das Gel bewegt (je nach Farbstoff und Agarose-Konzentration unterschiedlich).
6. Nach 90 Minuten ist die Elektrophorese beendet und wird anhand der Farbfront ausgewertet

Der zu überprüfende Abschnitt des Gels wird nun mit einem Skalpell herausgeschnitten und anschließend mit Hilfe von UV-Licht photodokumentiert. Dazu wird das Gel unter einer UV-Lampe untersucht. Durch das Ethidiumbromid, welches sich in die DNA-Struktur eingelagert hat, kommt es wie beschrieben zu Lumineszenzen im ultravioletten Licht.

3.2.6 Analyse der PCR-Produkte durch DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung stellt eine analytische Verfahrensweise zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolgen in DNA-Molekülen dar. Es existieren mehrere DNA-Sequenzierungsmethoden, zu denen unter anderen die nicht mehr praktizierte Methode nach Maxam und Gilbert (1977), die Didesoxymethode nach Sanger (1977), das Cycle-Sequencing und die Pyro-Sequenzierung gehören.

Das Prinzip der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger 1977), auch „Kettenabbruchmethode“ genannt, beruht auf dem basenspezifischen Abbruch der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase. Ausgehend von einem kurzen Abschnitt bekannter Sequenz, dem Primer, wird durch eine DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix thermolytisch so denaturiert, dass Einzelstränge für die folgende Prozedur zur Verfügung stehen. In vier größtenteils identischen Ansätzen mit jeweils enthaltenen radioaktiv ^{35}S markierten Nukleotiden wird je eine der vier Basen zum Teil als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zugegeben (also je ein Ansatz mit entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP). Diese ddNTPs mit fehlender 3'-Hydroxygruppe induzieren bei Einbau in den neosynthetisierten komplementären Strang einen Kettenabbruch, da eine Elongierung dieses DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase aufgrund fehlendem kovalenten Bindungspartner in Form einer Hydroxylgruppe für die Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids nicht mehr möglich ist. Konsekutiv entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP als Terminator enden (also nur mit A oder C oder G oder T). Nach der Sequenzier-Reaktion werden die so markierten Abbruchprodukte aus jedem Ansatz mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese den Längen nach aufgetrennt. Durch den Vergleich der vier Ansätze kann

man die Nukleotidabfolge nach der Entwicklung des radioaktiven Gels auf einem fotografischen Film als Autoradiogramm ablesen. Die dementsprechend komplementäre Sequenz ist die Sequenz der verwendeten einsträngigen DNA-Matrize.

Neuere Verfahren wie das Cycle-Sequencing als Weiterentwicklung der Didesoxymethode nach Sanger arbeiten mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden als Terminatoren. Jeder der vier verschiedenen Terminatoren ist mit zwei miteinander interagierenden Farbstoffen – einem Fluoreszenz-Donorfarbstoff und einem Rhodamin-Akzeptorfarbstoff - gekoppelt. Die resultierenden Fragmente werden im Fluoreszenz-Detektor bestimmt und anhand von farbigen Peakdiagrammen visualisiert.

In der vorliegenden Arbeit kam das Cycle-Sequencing-Verfahren zur Anwendung. Hierfür wurde der Sequenzierservice des Institutes für medizinische Mikrobiologie und Virologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, genutzt.

Die hier erhaltenen Gensequenzen mussten mit Hilfe eines Datenbankabgleiches den *Malassezia*-Spezies zugeordnet werden.

3.2.7 Zuordnung von unter Punkt 3.2.6 erhaltenen Nukleotidsequenzen durch Gendatenbankabgleich

Die Zuordnung der Gensequenzen erfolgte mittels des Programmes „BLAST®“ (Basic Local Alignment Search Tool) der öffentlichen Gen-Datenbank des National Center for Biotechnical Information (NCBI), das unter der Website „<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>“ im Internet aufrufbar ist. Auf dieser Website ist der Link „nucleotide blast“ („blastn“) oder direkt die Website „http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome“ zu aktivieren, um in das Eingabefenster („Enter Query Sequence“) zu gelangen. In dieses ist die bestimmte Nukleotidsequenz einzufügen. Zusätzliche Angaben sind erforderlich. Unter „Choose Search Set“ ist in der Version BLASTN 2.2.29+ als Datenbasis („database“) „Others“ anzuklicken sowie im Scroll-Down-Menü „Nucleotide collection (nr/nt)“ zu wählen. Optional kann „*Malassezia*“ unter „Organism“ angegeben werden. Unter „Program Selection“ „Optimize for“ „Highly similar sequences (megablast)“ („HSP“) aktivieren. Schließlich auf den „BLAST“-Button klicken und den Suchvorgang so starten. Es erscheint zeitlich verzögert ein Ausgabefenster mit allgemeinen Suchanfrage-Angaben (wie Zeitpunkt der Anfrage/RID, Anfrage-ID, Molekulartyp, Datenbankname, Blastversion, etc.) zur eingegebenen Nukleotidsequenz, einer farblich-grafischen Zusammenfassung von auf die Suchsequenz in der Datenbank herausgesuchten Blast Hits, die

Beschreibung („Descriptions“) mit „Sequences producing significant alignments:“ und folgender tabellarischer Auflistung der *Malassezia* Spezies mit Stammaufführung und Datenbanktreffercharakterisierung anhand von „Max Score“, „Tot Score“, „Query Cover“, „E value“, „Ident“ und „Accession“, und eine abschließende detaillierte Aufführung der „Alignments“. Ausgewählt wurde die *Malassezia*-Spezies, die unter Beschreibung in der Datenbanksuchabfrage am Wahrscheinlichsten die gesuchte Nukleotidsequenz unter Berücksichtigung der statistischen Parameter Maximaler Score, Totaler Score, Anfrageübereinstimmung, E-Wert wie der Identität reflektierte. Die BLASTN-Ergebnistabellen sind nach der von der Richtung Null ansteigenden Ausprägung des Erwartungswertes der Datenbanktreffer von oben nach unten aufgelistet mit dem Bedeutsamsten oben in der Tabelle. Wenn Erwartungswerte unterschiedlicher Treffer identisch sind, wird als nachfolgender nachrangiger Listungs-Parameter der maximale Score verwandt.

BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides [Altschul et al. 1990]) findet mit seinem Algorithmus das am besten bewertete lokale optimale Alignment (engl. für Abgleich, Ausrichtung, Anordnung, Zuordnung) einer Nukleotid-Eingabesequenz im Abgleich mit allen Nukleotidsequenzen der Datenbank „nr“ der NCBI. Ein Alignment dient dem Vergleich zweier oder mehrerer Zeichenfolgen („Strings“, z.B. ATGAC) zur Feststellung funktioneller oder evolutionärer Verwandtschaft von Nukleotidsequenzen. Beim Alignment werden die Elemente einer untersuchten Zeichenfolge/Sequenz denen der anderen Zeichenfolge/Sequenz so zugeordnet, dass die Reihenfolge erhalten bleibt und jedes Element einem anderen Element oder einer Leerstelle (Gap, Lücke) in jeder Zeichenfolge/Sequenz zugeordnet ist. Eine Fehlpaarung in dem Alignment entspricht einer Mutation. Die Gaps hingegen weisen auf eine Deletion oder eine Insertion (Indel) hin. Die einander zugeordneten (alignierten) Elemente sollten identisch oder möglichst ähnlich sein, weil viele gleiche oder ähnliche Elemente in gleicher Reihenfolge auf eine evolutionäre oder funktionelle Verwandtschaft hinweisen. Die Ähnlichkeit der Elemente wird meist vorgegeben und hängt von den Eigenschaften der verwendeten Daten oder Scoring Matrizen ab. Damit ein sinnvolles Alignment möglich ist und da die Sequenzen oft unterschiedlich lang sind, dürfen Gaps in die Sequenzen eingefügt werden (Wikipedia „Alignment“).

Als optimales Alignment wird im BLAST-Glossar eine Zuordnung zweier Sequenzen mit dem höchst möglichen Score beschrieben; als lokales Alignment ein Abgleich einer hochscorigen Region („HSP“), also einer Teilsequenz zweier Nukleotidsequenzen [Fassler et al. 2011]. Ein Alignment kann global, semiglobal oder auch lokal sein. Die Bestimmung von

Alignments unterschiedlicher Länge erfolgt vorzugsweise mit der Methode der Untersuchung auf lokale Alignments. Hier wird das beste Alignment zwischen zwei Substrings (String = Zeichenfolge/Teilsequenzen) der beiden Sequenzen gesucht, Gaps am Ende des Alignments, die durch Basendeletionen oder Baseninsertionen verursacht sein können, werden ignoriert.

Das Alignment von zwei Sequenzen wird als paarweises Alignment bezeichnet, das von mehreren als multiples Alignment.

Der klassische Algorithmus zur Berechnung von optimalen lokalen Alignments ist der Smith-Waterman-Algorithmus, der unter Punkt 3.2.8 näher beschrieben wird. Als Ergebnis liefert das Programm BLASTN eine Reihe optimaler lokaler Alignments, d.h. Gegenüberstellungen von Segmenten der Datenbankabfragesuchsequenz mit ähnlichen Segmenten von Nukleotidsequenzen aus der Datenbank unter Angabe von statistischen Parametern zur Einschätzung der Signifikanz. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick.

Tabelle 6: Überblick der verschiedenen in der BLAST-Ausgabe angeführten statistischen Parameter und deren Erklärung

Maximum Score	Höchster Alignment-Score (bit-score) zwischen der Eingabesequenz und des gefundenen Datenbanksequenzsegments.
Total Score	Summe der Alignment Scores aller Segmente der gleichen Datenbank-nukleotidsequenz, die mit der Eingabesequenz übereinstimmt und über alle Segmente berechnet ist. Dieser Score unterscheidet sich vom Maximum Score, wenn zahlreiche Teile der Datenbanksequenz mit verschiedenen Teilen der BLASTN-Eingabesequenz übereinstimmen.
Query Coverage	Prozentualer Anteil der Eingabesequenzlänge, der in den zugeordneten Segmenten enthalten ist.
E value	In 3.2.8 beschrieben.
Identity	Prozentuales Ausmass, in dem zwei verglichene Nukleotidsequenzen die gleichen Residuen an den gleichen Positionen in einem Alignment haben.

Der Maximum Score wird als höchster Alignment-Score bei Alignments zwischen der BLASTN-Eingabesequenz und des Datenbanksuchtreffers angegeben. Eine Änderung des Scores ist oft wichtig. Bei einem plötzlichen Abfall dieses Scores kann eine Veränderung in der Eingabesequenz-Suchtreffer Alignment-Länge oder –Qualität oder beiden vorliegen.

Der Total Score ist die Summe der Alignment Scores aller mit der Eingabesequenz übereinstimmenden Segmente der gleichen Datenbanknukleotidsequenz, die über alle Segmente berechnet ist. Dieser erlangt insbesondere bei multiplen, nicht

zusammenhängenden Abschnittsähnlichkeiten zwischen der Eingabesequenz und dem Datenbanksuchetreffer Relevanz. Für jeden Genabschnitt mit Ähnlichkeit generiert BLAST ein Alignment und einen Score. Dieser Score unterscheidet sich vom Maximum Score, wenn zahlreiche Teile der Datenbanksequenz mit verschiedenen Teilen der BLASTN-Eingabesequenz übereinstimmen. Wenn der Maximum Score zum Total Score identisch ist, dann ist nur ein einziges Alignment erfolgt. Wenn der Total Score größer als der Maximum Score ist, dann müssen multiple Alignments bestehen und deren einzelne Scores summarisch den Gesamtscore bilden.

Das Query Coverage beschreibt, welchen prozentualen Anteil der Eingabesequenz gegenüber der Sequenz des Suchtreffers aligniert werden kann.

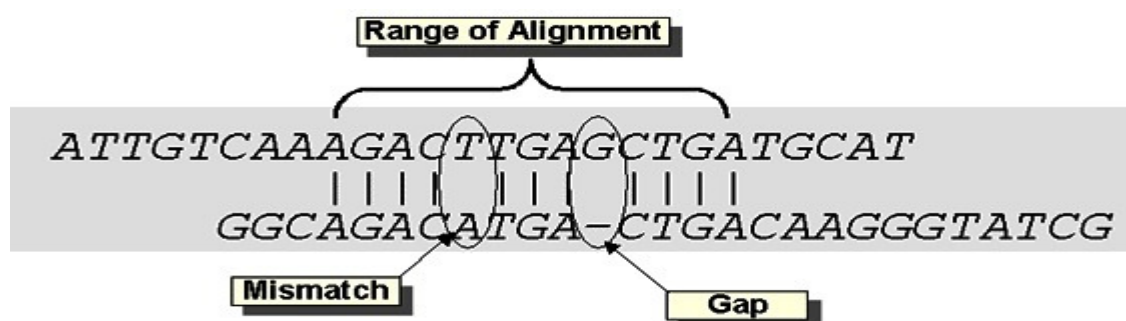
Der E-Wert wird unter Punkt 3.2.8 beschrieben.

Der Parameter „Identity“ beschreibt in einem Alignment das prozentuale Ausmass, in dem Positionen identischer Nukleotide zwischen dem alignierten Teil der Eingabesequenz und dem alignierten Teil des Datenbanksuchtreffers übereinstimmen.

3.2.8 Der E-Wert (E value, expectation value, Erwartungswert): $E = Kmn \times e^{-\lambda S}$

Laut BLAST-Glossar repräsentiert der E-Wert, auch Erwartungswert genannt, die Anzahl verschiedener Zuordnungen („Alignments“) mit Bewertungsziffern („Scores“), die gleich oder besser als das in einer Datenbankabfrage durch Zufall erwartete Auftreten des Parameter „S“ sind. Der Parameter Rohwert „S“ errechnet sich aus der Differenz der Summen der Substitutions- und Gap-Scores der abgeglichenen lokalen Alignments [Fassler et al. 2011]. Die folgende Grafik 5 aus dem BLAST-Glossar von Fassler et al. (2011) veranschaulicht die Ermittlung des „S“-Scores.

Grafik 5: der Rohwert „S“ (Abbildung aus Fassler et al. 2011)



$$S = \sum(\text{identities, mismatches}) - \sum(\text{gap penalties})$$

$$\text{Score} = \text{Max}(S)$$

Eine erweiterte Erwartungswertbeschreibung der NCBI erfolgt unter dem Item „FAQ“ „What ist he expect value“ unter der NCBI-Website

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ#expect:

Der Erwartungswert E ist ein Parameter, der die Trefferanzahl beschreibt, die man erwarten kann, durch Zufall zu sehen, wenn eine Datenbank einer bestimmten Größe nach einer Gensequenz durchsucht wird. Der Erwartungswert nimmt exponentiell ab, wenn der Score S der Übereinstimmung sich erhöht. Wesentlich ist, dass der Erwartungswert das zufällige Hintergrundrauschen beschreibt. Beispielsweise kann ein Erwartungswert von 1, der einem Treffer zugewiesen wird, in der Bedeutung derart interpretiert werden, dass man in einer Datenbank der gegenwärtigen Größe erwarten kann, dass eine Übereinstimmung von 1 mit einem ähnlichen Score einfach durch Zufall registriert werden kann. Je niedriger der Erwartungswert oder je näher an Null er ist, je bedeutsamer die Übereinstimmung. Es ist zu bedenken, dass virtuell identische kurze Zuordnungen („Alignments“) relativ hohe E-Werte haben. Das ist so, weil die Berechnung des E-Wertes die Länge der abgefragten Sequenz einkalkuliert. Diese höheren E-Werte machen Sinn, weil kürzere Sequenzen eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, in der Datenbank rein durch Zufall vertreten zu sein.

Der Erwartungswert kann auch zur Generierung eines Signifikanz-Schwellenwerts für Ergebnisberichte verwendet werden. Anhand der auf vielen BLAST-Suchabfrage-Seiten von der Grundeinstellung von 10 änderbaren Signifikanzschwelle kann durch eine Anhebung dieses Schwellenwertes eine ausgedehntere Liste mit dann mehr niedrig-scorigen Treffern erhalten werden [NCBI].

Der Algorithmus zur Berechnung des lokalen Alignments bzw. des Erwartungswertes ist der Smith-Waterman-Algorithmus. Das Ziel des Smith-Waterman-Algorithmus ist es, die Teilsequenzen mit der größten Übereinstimmung zwischen zwei Sequenzen zu finden. Ein solches Paar aus Teilsequenzen nennt man „lokales Alignment“.

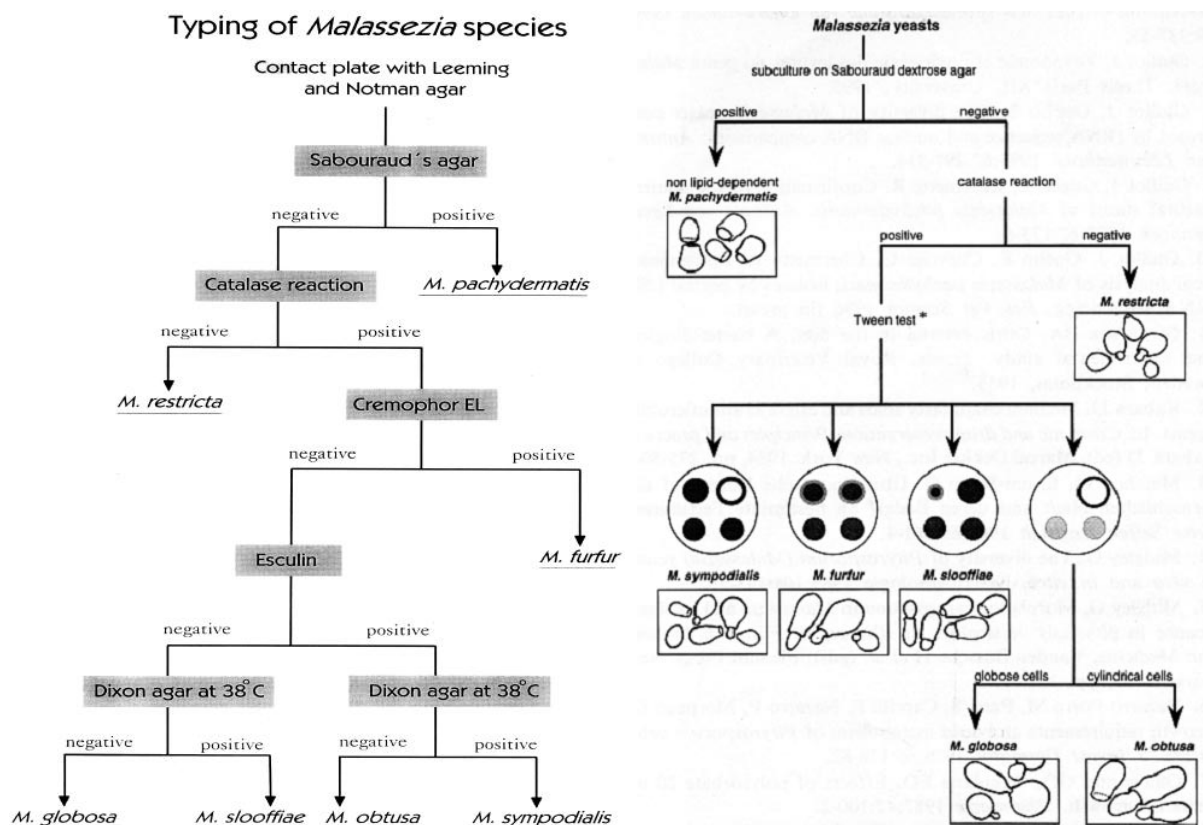
Der Smith-Waterman-Algorithmus berechnet das optimale lokale Alignment bzw. den optimalen lokalen Alignment-Score zwischen zwei Sequenzen a und b anhand der Formel $E = Kmn \times e^{-\lambda S}$, wobei „n“ die Länge der Suchsequenz und „m“ des Datenbanksuchsequenztreffers symbolisieren. „K“ und „λ“ stellen statistisch Skalierungsparameter für die Datenbanksuchraumgröße bzw. das verwendete Scoring-System dar. Beide werden für die Konversion vom „S“ in „S“ verwandelt. „S“ ist eine Bewertungsziffer („Score“) einer Zuordnung („Alignment“), die sich wie oben beschrieben als Differenz der Summen aus Substitutions- und Basenlücken-Bewertungsziffern („Gap-Scores“) zusammensetzt.

3.2.9 Methodologisches Prozedere in der Referenzarbeit von Gutsuz et al. (bisher von Gutsuz et al. nicht publiziert)

1996 publizierten Guillot et al. ein Differenzierungsschema für *Malassezia*-Hefen, dass Kaskaden-artig die Reaktion auf Subkultivierung auf Sabouraud-Agar, die Katalase-Reaktion, den Tween®-Test und schließlich die lichtmikroskopische Begutachtung umfasst. *M. globosa*, *M. obtusa* und *M. restricta* waren mittels Tween®-Test - der Assimilation der Tween®-Zubereitungen 20, 40, 60 und 80 - allein nicht unterscheidbar. Daher sind Ergänzungen durch Überprüfung der Katalase-Aktivität und eine Beurteilung der Mikromorphologie nach einwöchigem Wachstum auf modifiziertem Dixon-Agar bei 32 °C notwendig, um vier weitere Spezies differenzieren zu können [Guillot et al. 1996]. Grafik 6 zeigt das Verfahrensschema im rechten Abschnitt.

Faergemann veröffentlichte 2002 ein anderes Differenzierungsschema, anhand dessen die sieben bis dahin bekannten *Malassezia*-Spezies unterschieden werden konnten. Es beinhaltet als Kaskaden-artiges Flussschema Wachstum auf lipidfreiem Sabouraud-Agar (positiv nur *M. pachydermatis*), der Katalasereaktion (negativ nur *M. restricta*), Wachstum auf Cremophor® EL (positiv nur *M. furfur*), Wachstum auf Eskulin-Agar und Wachstum auf Dixon-Agar bei 38 °C (auf beide negativ: *M. globosa*, auf beide positiv: *M. sympodialis*, Eskulin positiv, Dixon negativ: *M. obtusa*, Eskulin negativ, Dixon positiv: *M. slooffiae*) [Faergemann 2002].

Grafik 6: Typisierung von *Malassezia*-Spezies nach Faergemann 2002 und Guillot 1998



Gutsuz et al. vollzogen das Schema von Gueho und Guillot mit der Tween®-Auxanografie in einem ersten Schritt nach und entwickelten in der Folge ein auf den beiden vorgenannten Schemata nach Gueho und Guillot (1996) sowie nach Faergemann (2002) basierendes eigenes phänotypisches Differenzierungssystem.

3.2.9.1 Testung der Tween®-Auxanografie als Tween®-Cremophor®-Auxotypie

Gutsuz et al. praktizierten initial die Tween®-Cremophor®-Auxotypie entsprechend der von Schütz 2003 in ihrer Inauguraldissertationsarbeit beschriebenen Methodik. Im ersten Schritt wurden Hefekulturen bis zu vier Tage auf (m)-Dixon-Agar subkultiviert. Dann erfolgte unter einer Sterilbank die Auflösung von ca. 1-2 Ösen Hefekulturen (1 Öse entsprechend 10⁵ Zellen pro ml) in 1-2 ml Aqua dest, um 2 ml Testhefe zu erhalten.

Für die Zubereitung der Tween®-Auxanografie wurden zu 8,25 g Selektivagar für pathogene Pilze (Fa Merck, Darmstadt) 250 ml Aqua dest. hinzugegeben, verrührt und bei 1 bar 30 min lang bei 121°C autoklaviert. Im nächsten Schritt wurden 16 ml des Nährmediums in sterile 50 ml Plastikröhrchen gefüllt, diese auf etwa 40 °C erwärmt und dann die in Aqua dest. gelösten Hefekulturen eingemischt. Anschließend wurde das mit Pilzkulturen vermengte Nährmedium in sterile Kunststoffpetrischalen von 10 cm Durchmesser (Nunc, Roskilde, Dk) gegossen.

Nach Verfestigung des Mediums wurden in den Agar 5 Löcher mit einer 3 mm Stanze (Stiefel) gestanzt. Diese wurden mit jeweils einem der im Brutschrank auf 30 °C zur Viskositätsreduktion temperierten Tween® 20, 40, 60, 80 und Cremophor® EL bestückt. Mit einer 10 µl Pipette wurden die Lösungen dazu unverdünnt in die Stanzlöcher appliziert.

Nach etwa 3 bis 5 Tagen bei 30 bis 32 °C im Brutschrank finden sich typische Wachstumsmuster als Trübungszonen um die Stanzlöcher. Die Assimilationsmuster sind dann anhand des charakteristischen Wachstumsmusters zu evaluieren. Als positives Ergebnis wird ein Wachstumshof um das Stanzloch als Indiz der Assimilation des entsprechenden Additivums gewertet (Schütz 2003).

Im vom Gueho und Guillot 1996 beschriebenen Differenzierungsschema können mittels Tween®-Auxanografie eindeutig *M.symphodialis*, *M.furfur* und *M.slooffiae* identifiziert werden und *M.globosa*, *M.restricta*, *M.obtusa* wie *M.pachydermatis* nur unter Zuhilfenahme weiterer Untersuchungen wie Subkultivierung auf Sabouraud-Agar, Katalasereaktion und Lichtmikroskopie.

Die Cremophor EL®-Zugabe in ein zentrales Stanzloch ermöglicht die Identifikation von *M.furfur*.

3.2.9.2 Entwicklung phänotypischer Differenzierungsmethodik durch Gutsuz et al.

Initial wurden von Gutsuz et al. die Referenz- wie Wildstämme in Bezug auf das Metabolisierungsmuster in zwölf auxanografischen Ansätzen analysiert. Darunter erfolgte die neu entwickelte modifizierte Fettsäure-Auxanografie ohne die vier Tween[®]-Gemische, sondern ausschließlich mit Zugabe jeweils nur einer der in den Tween[®]-Gemischen enthaltenen sieben Fettsäuren in Eigelb als Emulgator pro Ansatz in insgesamt sieben Ansätzen, sowie Auxanografien auf Eskulin-Agar, 1b-Agar, Cremophor[®] EL-Agar, einem Selektivagar für pathogene Pilze als Negativkontrolle und einem (m)-Dixon-Agar als Positivkontrolle. Bei fehlender eindeutiger Zuordnung führten Gutsuz et al. eine Überprüfung auf Katalaseaktivität sowie eine lichtmikroskopische mikromorphologische Untersuchung durch. Grafik 7 fasst die Methodik in einer Darstellung zusammen.

Grafik 7: Verfahrensschema von Gutsuz et al. zur *Malassezia*-Differenzierung

Auxanografien auf:

- sieben Fettsäure-Auxanografien mit Eigelb als Emulgator,
- Eskulin-Agar
- Cremophor EL-Agar
- 1b-Agar
- Positivkontrolle auf (m)-Dixon-Agar,
- Negativkontrolle auf Selektivagar für pathogene Pilze



-
- | | |
|---------|---|
| - Ggf.: | - Überprüfung auf Katalaseaktivität im Objektträgertest |
| | - lichtmikroskopische mikromorphologische Analyse |
-

Die Herstellung der auxanografischen Fettsäure-Ansätze erfolgte nach folgendem Prozedere: Jeweils 5 ml der einzelnen Medien wurden direkt nach der Herstellung unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank in je ein Loch einer Mehrfachkulturschale (12 well, Corning, New York, USA) ausgegossen. Nach Erkalten wurde jeweils eine Kulturplatte mit einer der zu testenden, vier Tage alten, frisch vom (m)-Dixon-Agar gewonnenen Hefen beimpft. Dazu wurde in jeweils 1 ml Glycerin eine reiskorngroße Menge der Hefe suspendiert und je ein Tropfen dieser Suspension mit Hilfe einer Pasteurpipette auf den einzelnen Agar aufgebracht. Lediglich in den Eskulinagar wurde zusätzlich ein Tropfen mit Hilfe der Pipette tief

inokuliert. Die Platten wurden anschließend für 7 Tage bei 32 °C in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) inkubiert.

Je 3,3 g Selektivagar für pathogene Pilze (Merck, Darmstadt, FRG) wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und in einem Melag-Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG) autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde jeweils 1 g der Fettsäuren Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure hinzugegeben, mit einer Eigelblösung (siehe 3.1.3.2.6, Tabelle 5) emulgiert und mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 5,5 bis 5,8 titriert. Als Negativkontrolle wurde ein entsprechender Ansatz auf Selektivagar ohne Zugabe einer Fettsäure mitgeführt.

Für den Eskulinagar wurden 5,37 g Eskulin (Galle-Eskulin-Azid-Agar, Fa Sifin, Berlin, FRG) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und bei 1 bar 30 Minuten in einem Melag Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG) autoklaviert. Die Spaltung von Eskulin in Eskuletin, Glukose und ein Eisensalz wurde durch eine Verfärbung des Agars von hellbraun nach dunkelbraun/schwarz angezeigt. Das Testergebnis wurde nach fünf Tagen in Bezug auf eine Negativkontrolle ohne Inokulat beurteilt. Zur Verbesserung der Differenzierung von *M. furfur*, *M. slooffiae* und *M. sympodialis* hatte Mayser 1997 die β -Glukosidase-Aktivität mittels Eskulin-Agar (Sanofi Diagnostic Pasteur, Freiburg, BRD) getestet. Der in 100 ml Flaschen gelieferte Agar wurde im Autoklaven (Melag) verflüssigt und dann in sterile Reagenzgläser mit Verschluss gegossen. Die *Malassezia*-Spezies wurden mittels einer ausgeglühten Platinöse tief in den Agar inokuliert und anschließend bei 32°C inkubiert (Landgraf 2006). *M. obtusa* und *M. restricta* mangelt es an β -Glukosidase-Aktivität.

Zur Herstellung von 1b-Agar wurden 2 g Agar (Agar Agar reinst, Merck, Darmstadt, FRG) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Nach 30minütigem Autoklavieren bei 1 bar in einem Melag-Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG) und Abkühlen auf ca. 50° C wurden 3 ml Tween® 80 (Tween® 80 Atlas, Sigma, St. Louis, USA) und 0,3 g L-Tryptophan (L-Tryptophan, Fluka, Buchs, Schweiz) hinzugefügt. Wie Mayser und Inkampe 1998 publizierten, ist die Spezies *M. furfur* zur braunen Pigmentbildung in der Lage, wenn ihr als solitäre Stickstoffquelle L-Tryptophan dargeboten wird. Deshalb wurde u.a. zur Prüfung auf *M. furfur* der transparente 1b-Agar verwandt.

Wie Mayser et al. 1997 publizierten, läßt sich *Malassezia furfur* auch mit Hilfe von Cremophor EL® (Polyethylen-Glycol-35-Rizinusöl) von den anderen *Malassezia*-Spezies unterscheiden. Während es sich in der Studie von Mayser et al. um einen Agardiffusionstest handelte, wurde in der vorliegenden Arbeit das Cremophor® EL in Selektivagar für pathogene Pilze (Fa. Merck, Darmstadt) emulgiert. Nach Vorversuchen erwies sich die 4%ige gegenüber 8 und 12%igen Konzentrationen von Cremophor® EL als am geeignetesten. Zur Herstellung

wurden je 3,3 g Selektivagar für pathogene Pilze (Merck, Darmstadt, FRG) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und in einem Melag-Autoklaven Typ 23 (Melag, Berlin, FRG) bei 1 bar für 30 Minuten autoklaviert. Der Selektivagar für pathogene Pilze enthält neben 17 g Agar als Nährstoffe jeweils 10 g Glucose wie Sojamehlpepton. Zusätzlich sind 400 mg Cycloheximid und 50 mg Chloramphenicol als Inhibitoren möglicher weiterer bakterieller wie mykologischer Begleitflora zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden 4 ml Cremophor® EL (Fa Fluka, Buchs, Schweiz) hinzugefügt und der fertige Agar unter einer Laminar-air-flow Arbeitsbank in jeweils ein Drittel einer Mehrfachkulturschale (24 well, Corning, New York, USA) ausgegossen (Gutsuz et al., bisher nicht publiziert). *M.pachydermatis* ist die einzig beschriebene *Malassezia*-Spezies, die nicht obligat lipid-dependent ist und auf Selektivagar für pathogene Pilze daher als Einzige Wachstum zeigt.

Malassezia-Kulturen, die durch die unterschiedlichen vorhergehenden auxanografischen Untersuchungen nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden in einem weiteren Analyseschritt hinsichtlich ihrer Katalase-Aktivität überprüft. Der Katalase-Nachweis erfolgte als Objektträgertest (Guillot 1996). Die Katalase katalysiert die Zerlegung der bei Oxidationsreaktionen entstehenden Peroxide ($2 \text{ H}_2\text{O}_2 - \text{Katalase} \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Ein Tropfen des ID color Catalase-Reagenz (H_2O_2 10 Vol.3 %, Dickungsmittel 2%, Evans-Blau 0,00125%; Bio-Mérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) wurde auf einen Objektträger gegeben und darin eine Kolonie der *Malassezia*-Kultur mit einer Impföse eingerührt. Ein Aufschäumen zeigte die Katalase-Aktivität des Stammes an. Bei einer positiven Katalasereaktion kommt es zur Gasbildung bei Kontakt mit dem ID color Catalase-Reagenz (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich). Bei *M. restricta* wird, wie in der Literatur beschrieben, keine Gasbildung im Sinne einer negativen Katalasereaktion registriert.

Abschließend erfolgte, soweit durch die vorhergehende mykologische Diagnostik nicht eindeutig differenzierbar, die lichtmikroskopische mikromorphologische Beurteilung der übrigen *Malassezia*-Spezies nach einwöchigem Wachstum auf modifiziertem Dixon-Agar bei 32 °C. Hier können z.B. anhand der Formanalyse bei *M. globosa* globose Zellformen sowie bei *M. obtusa* zylindrische Zytomorphologien zur Identifikation herangezogen werden.

Tabelle 7: lichtmikroskopische Mikromorphologieeinordnung von sieben *Malassezia*-Spezies nach Gueho et al. 1996 bzw. eigener Beschreibung anhand von Internet-Bildmaterial

Spezies	Mikromorphologie
<i>M. pachydermatis</i>	schmale, zylindrisch bis ovoide Zellen (2-2,5 * 4-5 µm lang), breite Basis zur Sprossung, Sprossungsnarben besonders betont
<i>M. restricta</i> *	sphäroid bis leicht ovoid,
<i>M. furfur</i>	variable Zytomorphologie, überwiegend elongierte Zellen bis 6 µm Länge, die sphärisch oder oval sein können
<i>M. slooffiae</i>	kurze, kleine zylindrische Zellen (1,5-3,5 µm) mit Zellsprossung an einer breiten Basis
<i>M. sympodialis</i>	ovoid, 2-5 µm lang, sympodiale Sprossung, monopolare Erscheinung,
<i>M. obtusa</i> *	zylindrisch, z.T. mit leichter Einschnürung (Sprossung)
<i>M. globosa</i>	sphärische, globose Zellform 6-8 µm DM mit enger Sprossung

*eigene morphologische Beschreibung aufgrund von Abbildungen:

Bei *Malassezia*-Hefen findet sich auf normaler Haut ausschließlich die Sprosszellphase (bei Hautläsionen sowohl die Hyphen- als auch Sprosszellform, wobei die Hyphen relativ kurze, wenig septierte, z.T. halbmondförmig gekrümmte Hyphenstücke sind, die neben in Haufen angeordneten runden Pilzelementen liegen) (Nenoff 2001, aus Landgraf 2007).

3.2.10 Vergleich der phänotypischen Differenzierungsmethode mit dem molekularbiologischen Referenzverfahren

Der Verfahrensvergleich zwischen der phänotypischen Differenzierungsmethode mit modifizierter Fettsäureauxanografie und der molekularbiologischen Referenzmethode der ITS1-rDNA-Sequenzierung in Verbindung mit der Zuordnung durch BLASTN soll bei 17 Referenz- und 26 Wildstämmen von *Malassezia*-Spezies durch Bestimmung der Übereinstimmungsrate beider Verfahren untereinander sowie bei den Referenzstämmen auch in Bezug auf die vorbekannten *Malassezia*-Spezies erfolgen. Zudem ist die tabellarische Gegenüberstellung der jeweiligen Ergebnisse beabsichtigt.

4. Ergebnisse

4.1 Anzucht der *Malassezia*-Hefen

4.1.1 Anzucht der Hefen für die Versuche von Gutsuz et al.

Nach siebentägiger Inkubation bei 32° C in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) wurden die Auxanogramme ausgewertet. Bei der Testung der Wildisolate dienten dabei die Ergebnisse mit den *Malassezia*-Referenzstämmen als Maßstab.

Bei den Fettsäuremedien, den Kontrollen und dem Cremophor EL[®]-Agar wurde als positives Wachstum ein zusammenhängender Pilzrasen gewertet. Bei Eskulin- und 1b-Agar wurde die Verfärbung des Agars beurteilt. Bei Eskulin galt die Schwarzfärbung und der Verlust der Transparenz als positiv, beim 1b-Agar die bei den *M. furfur*-Referenzstämmen zu beobachtende typische orange-bräunliche Färbung (Gutsuz et al., bisher nicht veröffentlicht).

4.1.2 Anzucht der Hefen für die Referenzmethode ITS1-rDNA-Sequenzierung

Die Stämme wurden sowohl auf (m)-Dixon-Agar als auch auf Leeming-Notman-Agar inokuliert. Die Temperatur für optimales Wachstum der *Malassezia*-Hefen lag bei 32 °C. Die Kultivierungsdauer bei 32 °C in einem Brutschrank betrug drei bis vier Tage mit folgender Entnahme von Kulturanteilen mittels einer hitzesterilisierten Platinöse für den nachfolgenden Schritt der DNA-Extraktion. Makroskopisch imponierten die Kulturen als weißliche Kolonien mit teils glattem, teils rauhem Wachstumsmuster mit unregelmässiger Begrenzung.

4.2 *Malassezia*-Speziesidentifikation bei Referenz- und Wildstämmen mittels Methodik von Gutsuz et al.

Gutsuz et al. testeten in Vorversuchen zur Speziesidentifikation von *Malassezia* ein phänotypisches Differenzierungssystem nach Gueho und Guillot mit Tween[®]-Auxanografien und entwickelten aufgrund unbefriedigender Ergebnisse ein neues phänotypisches Differenzierungssystem mit modifizierter Fettsäure-Auxanografie sowie der Verwendung ergänzender konventioneller Methoden wie Cremophor EL[®]-, 1b-Agar-, Selektivgar-Auxanografie, Überprüfung der Katalaseaktivität und der lichtmikroskopischen Analyse.

4.2.1 Testung mit Tween[®]-Cremophor[®]-Auxotypie im Vorversuch durch Gutsuz et al.

Bei der Anwendung der Tween[®]-Cremophor[®]-Auxotypie durch Gutsuz et al. am hiesigen Universitätsklinikum fiel bei diesen Untersuchungen auf, dass weder bei einem der untersuchten *M. sympodialis*-Referenzstämmen noch bei irgendeinem der als *M. sympodialis* eingeordneten Wildstämmen ein eindeutig differenzierbares Wachstumsmuster nachzuweisen war. Anstelle dessen war das Wachstumsmuster identisch mit dem von *M. furfur*. Dass es sich

bei den getesteten Stämmen aber nicht um *M. furfur* handeln kann, zeigte die fehlende Assimilation von Cremophor EL[®]. Die Cremophor EL[®]-Assimilation besteht bei den *Malassezia*-Spezies nur bei *M. furfur*. Somit war allein durch den konventionellen Tween[®]-Test bei diesen Untersuchungen nur *M. slooffiae* von den anderen obligat lipophilen Spezies abgrenzbar. Dies bewog Gutsuz et al. am hiesigen Universitätsklinikum zur Entwicklung eines neuen Differenzierungssystems.

4.2.2 Differenzierungssystem mittels u.a. modifizierter Fettsäure-Auxanografien

In den folgenden beiden Tabellen 8 und 9 sind die durch das *Malassezia*-Differenzierungssystem von Gutsuz et al. identifizierten *Malassezia*-Spezies mit auxanografischen Metabolisierungsmuster und, wenn zur weiteren Differenzierung nötig, auch die Katalasereaktion und die mikromorphologische Begutachtung durch Lichtmikroskopie aufgeführt.

Die auxanografischen Metabolisierungsmuster waren innerhalb einer Spezies unter den verschiedenen Stämmen nicht durchgehend identisch, d.h. die untersuchten verschiedenen Stämme einer Spezies unterschieden sich mitunter in der Verstoffwechselung dargebotener Nährstoffquellen.

Unter Caprinsäure (C10) zeigte sich einheitlich kein Wachstumsverhalten. Unter Laurinsäure (C12) entwickelte sich nur bei *M. furfur*-Stämmen Wachstum. Bei Myristin- (C14) wie Palmitinsäure (C16) erfolgte durchgängig kein Wachstum bei *M. restricta* und *M. obtusa*. Stearinsäure (C18), Ölsäure (C18:1) wie Linolsäure (C18:2) führten nur bei *M. furfur* und *M. pachydermatis* zu Kolonienwachstum.

M. pachydermatis ist einziger auf der Negativkontrolle Selektivagar als wachsend eingestufte *Malassezia*-Spezies. Auf der Positivkontrolle (m)-Dixon-Agar zeigte nur ein *M. restricta*-Stamm kein Wachstum.

Als 1 b-Agar- wie Cremophor EL[®]-positiv erschienen nur *M. furfur*-Stämme und *M. pachydermatis*. Esculin-Agar-positiv imponierte durchgehend *M. sympodialis*. Des Weiteren positiv zeigten sich hier bis auf einen sämtliche *M. furfur*-Stämme, der untersuchte *M. obtusa*-Stamm sowie fraglich der untersuchte *M. pachydermatis*-Stamm. Konsistent Esculin-Agar-negativ imponierten *M. dermatis* und *M. restricta*. *M. globosa* wurde Stamm-abhängig z.T. auch Esculin-positiv eingestuft.

Tabelle 10 fasst die typischen Metabolisierungsmuster der untersuchten verschiedenen *Malassezia*-Spezies zusammen.

Insgesamt zeigt sich, dass allein anhand der modifizierten Fettsäure-Auxanogramme und der Auxanogramme auf Esculin-Agar, Cremophor EL[®]-, (m)-Dixon Agar, Selektivagar und 1 b-Agar nur die Spezies *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis* und *M. obtusa* (letzterer nur Esculin und Dixon positiv) differenziert werden können. Um die übrigen Spezies abzugrenzen, müssen sich weitere Untersuchungen wie die Katalasereaktion und die Lichtmikroskopie anschließen. In der erweiterten Testungsanordnung wurde deshalb für *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. dermatis* und *M. restricta* die Katalasereaktion geprüft, die nur bei den *M. restricta*-Stämmen einheitlich negativ ausfiel. Uniform positiv zeigten sich nur in der Reaktion alle überprüften *M. slooffiae*-Stämme.

Mikromorphologisch imponierten *M. globosa* wie *M. dermatis* sphärisch und *M. slooffiae* länglich bis ovoid und *M. restricta* ovoid.

Die Referenzstämme von *M. restricta* zeigten als einzige *Malassezia*-Spezies keine Katalaseaktivität, *M. dermatis* bei zwei der drei untersuchten Kulturen. Demzufolge wurde für die Wildstämme 114, 115, 871/04 und Weber geschlussfolgert, dass sie zu einer dieser beiden Spezies gehören. Die übrigen Wildstämme gehören dementsprechend *M. globosa* oder *M. slooffiae* an.

Bei den Katalase-positiven, runden Zellen muss es sich um *M. globosa* handeln. Die Katalase-positiven, ovalen oder länglichen Zellen stellen *M. slooffiae* dar.

Die Katalase-negativen, runden Zellen gehören der Spezies *M. dermatis* an, die Katalase-negativen, ovalen Zellen der Spezies *M. restricta* (Gutsuz et al., bisher nicht veröffentlicht).

Tabelle 8: *Malassezia*-Speziesidentifikation anhand des von Gutsuz et al. entwickelten Testsystems mit Fettsäure-Auxanogrammen C10 (Caprinsäure), C12 (Laurinsäure), C14 (Myristinsäure), C16 (Palmitinsäure), C18 (Stearinsäure), C18:1 (Ölsäure), C18:2 (Linolsäure), Kultivierungen auf (m)-Dixon-Agar, auf Cremophor EL, Esculin-Agar, 1b-Agar, Selektivagar („SA“) sowie bei dann noch unklarer Differenzierung ergänzender Katalasereaktion und ggf. supplementierender lichtmikroskopischer Analyse („LMA“) bei Referenzstämmen. PK: Probenkennung, „+“ = positiv, „-“ = negativ, n.Ü. = nicht überprüft/nicht angewandt

PK	Spezies	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	Dixon	Cremophor	Esculin	1b	SA	Katalase	LMA
CBS 1	<i>M. sympodialis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 2	<i>M. sympodialis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 22	<i>M. globosa</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	n.Ü.
CBS 24	<i>M. dermatis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	n.Ü.
CBS 26	<i>M. obtusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 28	<i>M. slooffiae</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	n.Ü.
CBS 30	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 32	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 34	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 36	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 38	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 40	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 44	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.
CBS 58	<i>M. restricta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.Ü.
CBS 60	<i>M. pachydermatis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+/	+	+	n.Ü.	n.Ü.
CBS 64	<i>M. slooffiae</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	länglich
CBS 82	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	n.Ü.	n.Ü.

Tabelle 10: Zusammenfassung der typischen Metabolisierungsmuster durch verschiedene *Malassezia*-Spezies sowie der Katalase-Reaktion untersuchter Referenz- und Wildstämme:
 „+“ = positiv, „-“, = negativ, „v“ = variabel

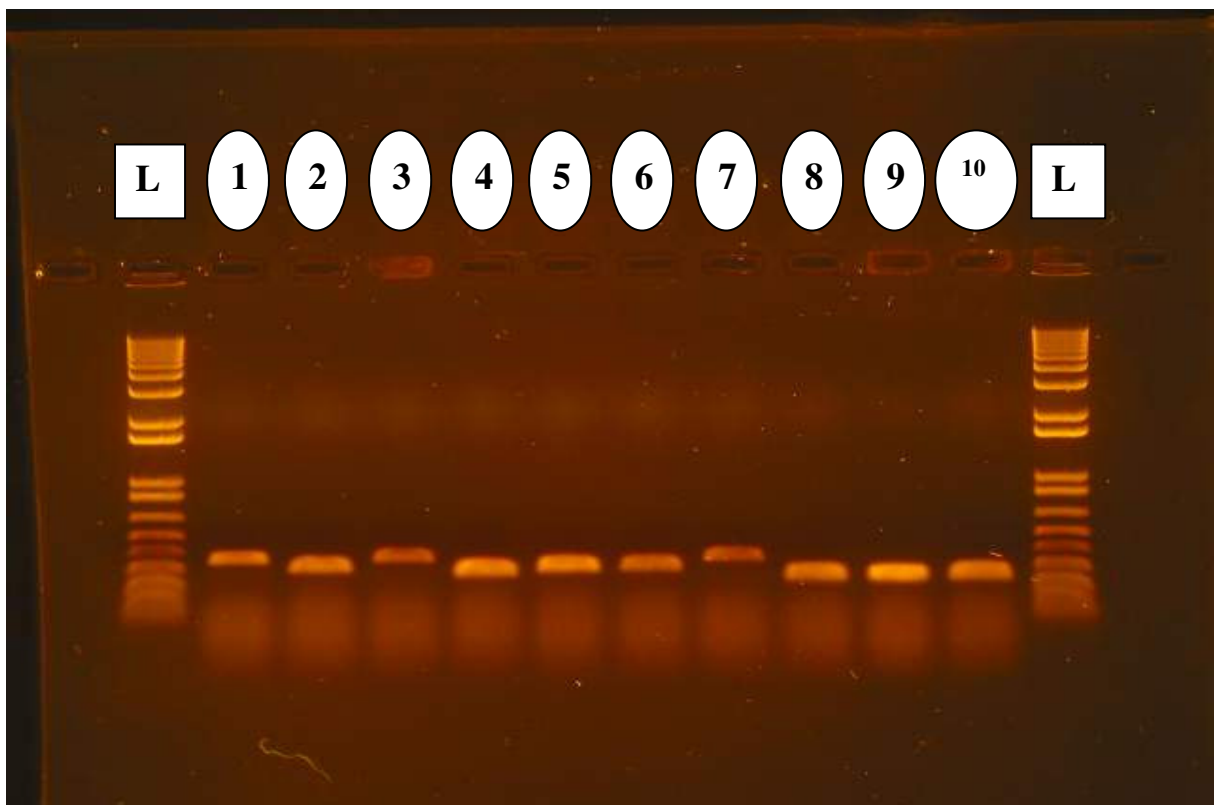
Spezies	C 10	C 12	C 14	C 16	C 18	C 18:1	C 18:2	Esculin	1b	C-EL	SA	Katalase
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>M. pachydermatis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+
<i>M. sympodialis</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>M. dermatis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	- (+)
<i>M. slooffiae</i>	-	v	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. globosa</i>	-	-	+	v	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. restricta</i>	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

C 10: Caprinsäure; C12: Laurinsäure; C14: Myristinsäure; C16: Palmitinsäure; C18: Stearinsäure; C18:1: Ölsäure; C18:2: Linol-Säure; Esculin: Esculin-Agar; 1b: 1b Agar; C-EL: Cremophor EL-Agar; SA: Selektivagar; Katalase: Katalase-Reaktion

4.3 PCR, Auftrennung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese und Nachweis im UV-Licht

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte die Amplifizierung von zuvor aus den gezüchteten Wild- und Referenzkulturen extrahierter DNA. Zum DNA-Nachweis konnte durch das mit Ethidiumbromid versetzte Agarosegel in der Gelelektrophorese das PCR-Produkt mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Es sind dann einzelne, klare Banden zu erkennen. Zieht man die im elektrischen Feld mitgewanderten DNA-Leiter als Bezugsgröße heran, wird deutlich, dass die genauen Längen der verschiedenen Banden innerhalb der einzelnen Spezies variieren, sich aber alle in der Größenordnung um die 200 bis 300 Basenpaare befinden. In Abbildung 2 ist ein Beispiel dargestellt. Im Anhang sind unter 9.2 weitere Photodokumentationen abgebildet.

Abbildung 2: DNA-Leiter und DNA-Produkte im UV-Licht nach Gelelektrophorese
„L“ zeigt den Lauf der DNA-Leitern, 1 *M. globosa*, 2 *M. sympodialis*, 3 *M. sympodialis*, 4 *M. restricta*, 5 *M. restricta*, 6 *M. restricta*, 7 *M. pachydermatis*, 8 *M. globosa*, 9 *M. sympodialis*, 10 *M. dermatis*



4.4 Analyse der PCR-Produkte nach ITS1-rDNA-Sequenzierung durch BLASTN

Die in den Analysen erhaltenen PCR-Produkte von 17 Referenzstämmen und 26 Wildstämmen der Gattung *Malassezia* wurden mit Hilfe des Suchprogrammes „BLASTN“ mit Datensätzen der Gendatenbank „nr“ der NCBI verglichen, in dem die in den

Laboranalysen erhaltenen DNA-Fragmente ähnlichen, bestenfalls identischen Nukleotidsequenzen der Gendatenbank zugeordnet und mit dem E-Wert und ggf. mit weiteren statistischen Parametern verifiziert wurden (2014 aktualisiert). Acht Spezies, *M. dermatis* (3 Stämme), *M. furfur* (12 Stämme), *M. globosa* (9 Stämme), *M. obtusa* (1 Stamm), *M. pachydermatis* (1 Stamm), *M. restricta* (4 Stämme), *M. slooffiae* (4 Stämme) und *M. sympodialis* (9 Stämme) sind differenziert worden. In den folgenden Tabellen sind die mittels der molekularbiologischen Methode differenzierten acht Spezies mit den aus der Datenbank erhaltenen statistischen Parametern aufgeführt. Der Wildstamm „PM 3“ musste als einziger abweichend von der unter Punkt 3.2.7 beschriebenen Datenbanksuchprozedere unter dem Unterpunkt „Program Selection“ „Optimize for“ „More dissimilar sequences (discontiguous megablast)“ abgeglichen werden, da unter „highly similar sequences (megablast)“ sich kein Datenbanksuchtreffer ergab.

Tabelle 11 zeigt die Spezieszuordnung der Referenzstämme nach Gendatenbankabgleich.

Tabelle 11 *Malassezia*-Spezieszuordnung der Referenzstämme nach Gendatenbankabgleich. Dargestellt sind Nukleotidsequenzlängen („NL“) in der Einheit „bp“ und zu dem wahrscheinlichsten Datenbanksuchabfragetreffer („Spezies in der Datenbank“) die statistischen Parameter Maximaler Score („Max Score“), totaler Score („Tot Score“), Suchanfrageabdeckung („Query Coverage“), Identität („Identity“) sowie der E-Wert („E-value“). Referenzstämme sind mit der Probenkennung (PK) „CBS“ gekennzeichnet.

Nr.	PK	Spezies in Datenbank	NL [bp]	Max Score	Tot Score	QueryCov [%]	Identity [%]	E-value
1	CBS 1	<i>M. sympodialis</i>	185	316	316	100	097	5e ⁻⁸⁷
2	CBS 2	<i>M. sympodialis</i>	238	440	440	100	100	4e ⁻¹²⁴
3	CBS 22	<i>M. globosa</i>	254	416	416	091	099	6e ⁻¹¹⁷
4	CBS 24	<i>M. dermatis</i>	144	254	254	100	099	3e ⁻⁶⁸
5	CBS 26	<i>M. obtusa</i>	303	501	501	091	099	2e ⁻¹⁴²
6	CBS 28	<i>M. slooffiae</i>	283	490	490	100	098	4e ⁻¹³⁹
7	CBS 30	<i>M. furfur</i>	202	348	348	099	098	2e ⁻⁹⁶
8	CBS 32	<i>M. furfur</i>	245	436	436	100	099	7e ⁻¹²³
9	CBS 34	<i>M. furfur</i>	294	521	521	100	099	1e ⁻¹⁴⁸
10	CBS 36	<i>M. furfur</i>	204	355	355	100	098	1e ⁻⁹⁸
11	CBS 38	<i>M. furfur</i>	283	492	492	099	098	9e ⁻¹³⁶
12	CBS 40	<i>M. furfur</i>	251	459	459	100	099	1e ⁻¹²⁹
13	CBS 44	<i>M. furfur</i>	285	521	521	100	099	1e ⁻¹⁴⁸
14	CBS 58	<i>M. restricta</i>	284	512	512	100	099	9e ⁻¹⁴⁶
15	CBS 60	<i>M. pachydermatis</i>	253	455	455	100	099	1e ⁻¹²⁸
16	CBS 64	<i>M. sympodialis</i>	144	220	220	100	094	2e ⁻⁵⁴
17	CBS 82	<i>M. furfur</i>	294	521	521	100	099	2e ⁻¹⁴⁸

Tabelle 12 zeigt die Spezieszuordnung der Wildstämme nach Gendatenbankabgleich.

Tabelle 12 *Malassezia*-Spezieszuordnung der Wildstämme nach Gendatenbankabgleich. Dargestellt sind Nukleotidsequenzlängen („NL“) in der Einheit „bp“ und zu dem wahrscheinlichsten Datenbanksuchabfragetreffer („Spezies in der Datenbank“) die statistischen Parameter Maximaler Score („Max Score“), totaler Score („Tot Score“), Suchanfrageabdeckung („Query Coverage“), Identität („Identity“) sowie der E-Wert („E-value“). Wildstämme sind mit der Probenkennung (PK) „PM“ gekennzeichnet.

Nr.	PK	Spezies in Datenbank	NL [bp]	Max Score	Tot Score	Query Cov%	Identity %	E-value
1	PM 3	<i>M. globosa</i>	141	66,2	66,2	037	091	7e ⁻⁰⁸
2	PM 4	<i>M. globosa</i>	189	333	333	100	98	5e ⁻⁹²
3	PM 6	<i>M. globosa</i>	197	292	292	100	94	8e ⁻⁸⁰
4	PM 8	<i>M. slooffiae</i>	281	492	492	100	98	1e ⁻¹³⁹
5	PM 10	<i>M. slooffiae</i>	284	520	520	100	99	5e ⁻¹⁴⁸
6	PM 12	<i>M. slooffiae</i>	293	326	326	100	88	1e ⁻⁸⁹
7	PM 14	<i>M. dermatitis</i>	249	392	392	085	99	1e ⁻¹⁰⁹
8	PM 16	<i>M. furfur</i>	280	501	501	100	99	2e ⁻¹⁴²
9	PM 18	<i>M. restricta</i>	276	246	332	064	100	9e ⁻⁶⁶
10	PM 20	<i>M. sympodialis</i>	248	446	446	100	099	6e ⁻¹²²
11	PM 42	<i>M. furfur</i>	278	488	488	100	098	1e ⁻¹³⁸
12	PM 46	<i>M. furfur</i>	200	326	326	100	096	8e ⁻⁹⁰
13	P48glo	<i>M. sympodialis</i>	187	346	346	100	100	6e ⁻⁹⁶
14	PM 50	<i>M. sympodialis</i>	179	302	302	100	097	1e ⁻⁸²
15	PM 52	<i>M. sympodialis</i>	204	366	366	100	099	5e ⁻¹⁰²
16	PM 54	<i>M. restricta</i>	332	540	540	099	096	5e ⁻¹⁵⁴
17	PM 56	<i>M. restricta</i>	225	390	390	100	098	3e ⁻¹⁰⁹
18	PM 62	<i>M. globosa</i>	280	448	448	098	096	2e ⁻¹²⁶
19	PM 66	<i>M. globosa</i>	270	436	436	100	095	5e ⁻¹²³
20	PM 68	<i>M. sympodialis</i>	153	231	231	100	094	1e ⁻⁶¹
21	PM 70	<i>M. furfur</i>	277	479	479	100	098	9e ⁻¹³⁶
22	PM 72	<i>M. sympodialis</i>	140	259	259	100	100	6e ⁻⁷⁰
23	PM 74	<i>M. globosa</i>	321	538	538	094	099	2e ⁻¹⁵³
24	PM 76	<i>M. globosa</i>	211	309	309	095	095	9e ⁻⁸⁵
25	PM 78	<i>M. dermatitis</i>	154	211	211	098	091	2e ⁻⁵⁵
26	PM 80	<i>M. globosa</i>	312	564	564	099	099	3e ⁻¹⁶¹

Abschließend ein konkretes Beispiel eines Datenbankabgleiches für den Referenzstamm „CBS 28“ mit einer Nukleotidsequenzsuchlänge von 283 Basenpaaren. Der Suchtreffer mit dem besten E-Wert wird oben in der Auflistung nebst den weiteren statistischen Parametern angeführt. Nach Aktivierung des Kontrollkästchens vor diesem Hit und nachfolgenden Anklicken von „Descriptions“ werden folgende Informationen angezeigt:

“*Malassezia slooffiae* isolate POL.69.09.III 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: gblKC141978.1| Length: 786 Number of Matches: 1
Related Information Range 1: 21 to 304 “ und

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
490 bits(265) 4e-139 279/285(98%) 3/285(1%) Plus/Minus					
Query	1	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGTGTTTTG			
60					
Sbjct	304	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGTGTTTTG			
245					
Query	61	TTCGTTGGTTGTGAACCAACATCAATCACGTTTCATACAAACATGCGTGTTTTT-AGAGAA			
119					
Sbjct	244	TTCGTTGGTTGTGAACCAACATCCATCACGTTTCATACAAACATGCGTGTTTTTATAGAGAA			
185					
Query	120	GGAAGGCGCCCGGACGCCATTAAGCAATCCAAACGCGCTTCCACACGGTGACAGGGTTT			
179					
Sbjct	184	GGAAGGCGCCCGGACGCCATTA-GCAATCCAAACGCGCTTCCACACGGTGACAGGGTTT			
126					
Query	180	GTGGATAAATAGTGGATTGGGGGAGAGGCACGTTGTGT-AGCGTGCGTATCTCAAACCCC			
238					
Sbjct	125	GTGGATAAATAGTGGATTGGGGGAGAGGCACGTTGTGTTAGCGTGCGTATCTCAAACCCC			
66					
Query	239	AGCCAATTCACCTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAACC	283		
Sbjct	65	AGGCAATTCACCTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACAGAAACC	21		

Zu Beginn werden *Malassezia*-Spezies mit Isolatbenennung und der zugeordnete Gensegmentsequenzloкус (u.a. 18 S-ribosomales RNA-Gen, ITS1-Region) benannt. Folgend u.a. neben der Sequenz-ID die Länge wie die Anzahl der Treffer. Dann die Alignment-Statistik. Zu erkennen sind die Basenabfolgen der Suchsequenz „Query“ mit der Nummerierung von 1 bis 283 und der Basensequenz des Datenbanktreffers. Es sind zwei Lücken („Gaps“) in der Suchsequenz integriert, die die Basenzahl der Suchsequenzlänge auf 285 erhöhen und einen relativen Anteil von 1 % aufweisen. In dieser Anordnung – dem lokalen Alignment – sind nun 279 von 285 Basen identisch, was prozentual 98 % entspricht („Identity“). Die als identisch gewerteten Basenpaare sind mit einem vertikalen Strich dazwischen gekennzeichnet. Zwei Basen sind durch das Einfügen der „Gaps“ different.

4.5 Ergebnisvergleich der Methodik von Gutsuz et al. mit der molekularbiologischen Bestimmungsmethode der ITS1-rDNA-Sequenzierung nach Makimura et al. (2000)

Die durch die phänotypische Differenzierungsmethodik von Gutsuz et al. mit u.a. modifizierter Fettsäure–Auxanografie erhaltenen Resultate werden mit denen durch die als Referenzmethode verwendete ITS1-rDNA-Sequenzierung und Datenbankabgleich der Nukleotidsequenzdatenbank „nr“ der NCBI verglichen, tabellarisch gegenübergestellt und die prozentuale Übereinstimmungsrate bei den Referenz- wie Wildstämmen bestimmt. In Tabelle 13 erfolgt der Vergleich der Speziesbestimmungen bei den Referenzstämmen, in Tabelle 14 bei den Wildstämmen.

Tabelle 13: Übereinstimmung der Speziesidentifikation untersuchter Referenzstämmen durch das von Gutsuz et al. entwickelte Differenzierungssystem inklusive der modifizierten Fettsäureauxanografie gegenüber der ITS1-rDNA-Sequenzierung als Referenzmethode

Labor-name	Referenz-stamm	Referenzstamm-Spezies	Ergebnis des Auxanogrammes	Ergebnis der ITS1-Sequenzierung	Identisch/nicht identisch
CBS 01	7222	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
CBS 02	7979	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
CBS 22	7966	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
CBS 24	9145	<i>M. dermatis</i>	<i>M. dermatis</i>	<i>M. dermatis</i>	identisch
CBS 26	7876	<i>M. obtusa</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. obtusa</i>	identisch
CBS 28	7861	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	identisch
CBS 30	7019	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 32	4162	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 34	4170	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 36	4171	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 38	6000	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 40	6046	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 44	EG658	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
CBS 58	7877	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	identisch
CBS 60	1892	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. pachydermatis</i>	identisch
CBS 64	42132	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. sympodialis</i>	anders
CBS 82	1878	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch

16 der 17 Referenzstämme wurden mittels der Differenzierungsmethodik nach Gutsuz et al. richtig identifiziert. Dies entspricht einer Übereinstimmungsrate in Bezug auf die vorbekannten Referenzstammspezies wie auch auf die Ergebnisse der ITS1-rDNA-Sequenzierung in Verbindung mit der Datenbanksuchabfrage der Datenbank „nr“ der NCBI von 94,1 %. Nur der Referenzstamm „CBS 64“ bzw. „42132“ wurde fehlbestimmt. Die ITS1-rDNA-Sequenzierung in Verbindung mit der Datenbank „nr“ der NCBI und dem Suchprogramm BLASTN ermittelte sämtliche Referenzstämme korrekt, d.h. eine Übereinstimmungsrate von 100 % mit den vorbekannten Referenzstämmen.

Unter den 17 überprüften Referenzstämmen befanden sich acht *M. furfur*-Stämme, drei *M. sympodialis*-Stämme und jeweils ein Stamm der Spezies *M. dermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. restricta* und *M. slooffiae*. Einzig nicht-identisch unter den Referenzstämmen differenziert worden ist die als mit *M. sympodialis* ATCC 42132 bestückte Probe CBS 64, die mit der Referenzmethode als *M. sympodialis*, aber mit dem Differenzierungssystem nach Gutsuz et al. als *M. slooffiae* identifiziert wurde.

Die auf der folgenden Seite abgebildete Tabelle 14 fasst die Bestimmungen der *Malassezia*-Spezies bei den 26 überprüften Wildkulturen zusammen. Hier erfolgte in 24 von 26 Fällen eine einheitliche Speziesidentifikation mit beiden Methodiken, was einer Übereinstimmungsrate von 92,3 % entspricht. Zu unterschiedlichen Ergebnissen kam es bei den Wildkulturen „Brauns“ und „Weber/glob“. Während es bei der Probe „Brauns“ zur Bestimmung der Spezies *M. slooffiae* bei der phänotypischen Methode kam, wurde molekularbiologisch *M. dermatis* identifiziert. Bei der Wildkultur „Weber/glob“ wurde mittels des Differenzierungssystems nach Gutsuz et al. *M. dermatis* und durch die ITS1-rDNA-Sequenzierung in Verbindung mit der Datenbanksuche *M. globosa* als Spezies zugeordnet. Unter den 26 Wildstämmen wurden durch die ITS1-rDNA-Sequenzierung in Verbindung mit der Datenbanksuch in der NCBI-Datenbank „nr“ insgesamt acht mal *M. globosa*, sechs mal *M. sympodialis*, vier mal *M. furfur*, jeweils drei mal *M. slooffiae* und *M. restricta* sowie zwei mal *M. dermatis* als enthaltene Spezies identifiziert.

Tabelle 14: Vergleich der Speziesidentifikationen untersuchter Wildstämme durch die von Gutsuz et al. entwickelte Differenzierungsmethodik mit u.a. der modifizierten Fettsäureauxanografie gegenüber der ITS1-rDNA-Sequenzierung als Referenzmethode: als Kolumnen Laborkennzeichnung, Wildstammkennzeichnung, Wildstammbezeichnung, Ergebnisgegenüberstellung

Labor-name	Wildstamm-bezeichnung	Ergebnis des Auxanogrammes	Ergebnis der ITS1-rDNA-Sequenzierung/ BLASTN	identisch/ anders
PM 3	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
PM 4	107	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
PM 6	117	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
PM 8	13	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	identisch
PM 10	Roscott	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	identisch
PM 12	Seibt	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	identisch
PM 14	Brauns	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. dermatis</i>	anders
PM 16	6094	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
PM 18	1639	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	identisch
PM 20	1647	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
PM 42	312	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
PM 46	Z2	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
PM 48	<i>V. a. M. globosa</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
PM 50	1414/04	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
PM 52	1399/04	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
PM 54	114	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	identisch
PM 56	115	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	identisch
PM 62	Beiß	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
PM 66	Weber/glob	<i>M. dermatis</i>	<i>M. globosa</i>	anders
PM 68	119/04	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
PM 70	Kreuz	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	identisch
PM 72	NN5	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	identisch
PM 74	12	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
PM 76	17	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch
PM 78	700/03	<i>M. dermatis</i>	<i>M. dermatis</i>	identisch
PM 80	871/04	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	identisch

5. Diskussion

Malassezia-Hefen können für eine Reihe von klinisch relevanten Krankheitsbildern wie z.B. die Pityriasis versicolor (Mayser 2012, Park 2012), das seborrhoische Ekzem (Sosa 2013, Goldenberg 2013, Zhang 2013), der *Malassezia*-Follikulitis (Ko 2011, Mota 2011), das atopische Ekzem (Gioti 2013, Koike 2013) so wie auch der Sepsis (Gaitanis 2012, Kaneko 2012, Curvale-Fauchet 2004) verantwortlich sein. Die Gattung *Malassezia* umfasst verschiedene Spezies mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf bestimmte antimykotisch wirksame Substanzen. Allein durch diesen Aspekt wird die Notwendigkeit einer differenzierenden Diagnostik ersichtlich. Daneben finden diagnostische Methoden zur Differenzierung von *Malessezia*-Spezies auch z.T. im Rahmen phylogenetischer Studien Anwendung (Crespo 2000, Oh 2010). Das Spektrum bisher angewendeter Verfahrensweisen ist vielfältig.

In dieser Arbeit wird die Anwendbarkeit einer nicht-molekularbiologischen Methodik zur Differenzierung der *Malassezia*-Spezies, bestehend aus der Kombination einer von Gutsuz et al. entwickelten modifizierten Fettsäureauxanografie, weiteren Auxanografien (Cremophor EL[®]-, Esculin-, 1b-, m-Dixon-Agar-Auxanografie, Selektivagar), der Katalasereaktion und der Lichtmikroskopie, durch die bereits etablierte molekularbiologische Methode nach Makimura et al. (2000) überprüft. Zur Untersuchung der Übereinstimmungsrate dieses von Gutsuz et al. modifizierten Fettsäureauxanogramms wurden 17 Referenzstämme und 26 Wildstämme der Gattung *Malassezia* nach beiden Verfahren spezifiziert und die Ergebnisse verglichen. Bei den untersuchten Stämmen, welche sowohl auf (m)-Dixon-Agar als auch auf Leeming-Notman-Agar verimpft wurden, handelt es sich um die acht Spezies *M. furfur* (12 Stämme), *M. pachydermatis* (1 Stamm), *M. globosa* (9 Stämme), *M. restricta* (4 Stämme), *M. sympodialis* (9 Stämme), *M. slooffiae* (4 Stämme), *M. dermatis* (3 Stämme) und *M. obtusa* (1 Stamm). Nach Durchführung der Spezifizierung dieser *Malassezia*-Stämme sowohl durch das Differenzierungssystem nach Gutsuz et al. als auch durch die molekularbiologische Methode nach Makimura et al. zeigte sich eine Rate der Übereinstimmung von 94,1 % (16 von 17) bei den Referenzstämmen und von 92,3 % (24 von 26) bei den Wildstämmen.

Es wird damit gezeigt, dass die von Gutsuz et al. entwickelte phänotypische Differenzierungsmethodik mit modifizierter Fettsäureauxanografie, Cremophor EL[®]-, Esculin-, 1b-, (m)-Dixon-Agar-Auxanografie, Selektivagar-Auxanografie in Verbindung mit der Überprüfung auf Katalaseaktivität und der Mikroskopie in der Lage ist, die Spezies *M. globosa*, *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis* sowie *M. dermatis* zu identifizieren.

In der alltäglichen Praxis finden weltweit unterschiedliche Verfahren zum Nachweis des *Malassezia*-Besatzes von Menschen und Tieren Anwendung. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten der Spezies *Malassezia* diskutiert und mit denen in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren verglichen.

Anfangs basierte eine Identifikation der *Malassezia*-Spezies auf morphologischen, physiologischen und biochemischen Kriterien, was sich zum Teil als zeitaufwändig und kompliziert erwies (Affes 2009). Auch die Differenzierung von physiologisch ähnlichen Stämmen wie *M. furfur* und *M. sympodialis* stellte sich oft als problematisch heraus (Guillot 2000). Daher wird bis heute an der Entwicklung phänotypischer Methoden gearbeitet, die kostengünstig, zuverlässig und in der Routinearbeit von Laboratorien einfach anzuwenden sind. Zum Beispiel erwies sich die phänotypische Methode des Kultivierens von verschiedenen Spezies auf Chrom-Agar zur Identifikation von klinisch wichtigen Spezies wie *M. globosa*, *M. restricta* und *M. furfur* als nützlich. Sie stellte sich als einfach anwendbar, schnell und kostengünstig heraus. Dennoch müssen zur Identifikation weiterer Spezies andere Verfahren wie zum Beispiel molekulare Methoden herangezogen werden. (Kaneko 2007). Auch in einer Studie von Trabelsi et al. zur Identifikation der *Malassezia*-Spezies an Pityriasis versicolor Erkrankten wurden phänotypische Methoden, wie der Tween-Assimilationstest, die Katalasereaktion und die Ureasereaktion angewandt. Aber selbst hier mußte ergänzend zur Identifikation des schwer anzüchtbaren *Malassezia restricta* wieder eine molekularbiologische Methode in Form der Nested PCR hinzugezogen werden (Trabelsi 2010). Auch in einer aktuellen Studie zur Identifikation von *Malassezia*-Spezies bei Patienten mit extremer Form der Pityriasis versicolor wurden morphologische Merkmale und physiologische Tests angewandt. Doch auch hier wurden zur Ergebniskontrolle molekularbiologische Methoden hinzugezogen (Romano 2013). Die auf Tween[®] basierenden Identifikationsmethoden erreichen ihre Grenzen durch die kontinuierliche Beschreibung neuer Spezies (Gaitanis 2009). Daher wird gegenwärtig die konventionelle Labordiagnostik zur Unterscheidung der *Malassezia*-Spezies durch molekularbiologische Techniken unterstützt (Hirai 2004).

Diese PCR-Technologie ist einfach, schnell und sicher anwendbar für die Differenzierung der Genus *Malassezia*. Besonders für die Abgrenzung von physiologisch ähnlichen Stämmen hat sich die molekularbiologische Methode als effizient erwiesen (Affes 2009).

Außerdem gelten die molekularbiologischen Verfahren als sensitive und schnelle Methoden für die genaue Speziesidentifikation von klinisch relevanten Pilzen und können leicht als Routinediagnostik eingeführt werden (Landlinger 2008).

Aktuell stehen verschiedene molekularbiologische Methoden zur Verfügung. Sie besitzen unter anderem den Vorteil, dass auf eine langwierige kulturelle Anreicherung verzichtet werden kann und bereits nach zwei Tagen die Probe zu einem Ergebnis führt (Gemmer 2002). Außerdem können so schwer in Kultur zu haltende Spezies wie *M. restricta* in ihrer tatsächlichen Häufigkeit widerspiegelt werden, ohne dass es zu falsch negativen Angaben kommt (Gemmer 2000).

Die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden stellen sich wie folgt dar:

Bereits 1996 konnten mit Hilfe der großen Untereinheit der ribosomalen DNA-D1/D2-Region (Guého 1995) die sieben Spezies *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* und *M. slooffiae* (Guillot 1995, Guého 1996) differenziert werden. Daraufhin wurden weitere molekulare Verfahren entwickelt, anhand derer fünf weitere Spezies, *M. equi* (Nell 2002), *M. dermatis* (Sugita 2002), *M. japonica* (Sugita 2003 b), *M. nana* (Hirai 2004), *M. yamatoensis* (Sugita 2004) und *M. caprae* (Cabañas 2007) klassifiziert werden konnten. Die nachfolgende Tabelle führt die verschiedenen molekularbiologischen Methoden zur Differenzierung von *Malassezia* spp. mit ihren Erstbeschreibern auf.

Tabelle 15: Molekularbiologische Methoden (Mayser 2006)

Genetischer Fingerabdruck (PCR-finger-printing)	Versalovic et al. 1991 Belkum et al. 1994
direkte rRNA-Sequenzierungs-Methode	Guillot et al. 1995
Pulsfeld-Gelelektrophorese (PGFE)	Boekhout et al. 1998
RAPD (zufällig vervielfältigte polymorphe DNA)	Boekhout et al. 1998
Karyotypisierung	Gupta et al. 2000
AFLP (vervielfältigender Fragment-Längen-Polymorphismus)	Theelen et al. 2001
DGGE (Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese)	Theelen et al. 2001
Sequenzierungsanalyse: a) Analyse der D1/D2-Region der großen Untereinheit der ribosomalen DNA b) Analyse der innen liegenden umschreibenden Abstandshalter-Regionen (ITS1/2) der ribosomalen DNA c) Analyse der IGS (genetische Abstandshalter-Region) der ribosomalen DNA	a) Guého et al. 1995 b) Makimura et al. 2002 c) Sugita et al. 2003
Restriktionsanalyse der PCR-Amplikone: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) Terminaler-Fragment-Längen-Polymorphismus (tFLP)	Gaitanis et al. 2002 Gemmer et al. 2002 Mirhendi et al. 2005
Chitin-Synthase-Gensequenzanalyse	Aizawa et al. 2001

Mittels dieser Verfahren ist die Gattung *Malassezia* weiter differenziert worden und beinhaltet inzwischen 14 Spezies, welche anhand physiologischer und morphologischer Kriterien nicht unterschieden werden können (Cafarchia 2011). Dies wird auch in einer Studie von Akaza et al. (2010) dargelegt. Hier wird gezeigt, dass Differenzierungsmethoden, welche von einem Wachstum der verschiedenen Spezies in Kultur abhängig sind, nur eingeschränkt anwendbar sind. Dafür wurden Jahreszeit-abhängig *Malassezia*-Spezies enthaltene Proben von gesunder Haut entnommen, die Spezies isoliert, durch die PCR-Methode identifiziert und mit auf Leeming-Notman-Agar angelegten Spezies verglichen. Da das Wachstum der Kolonien auf der Haut im Sommer eingeschränkt ist, erwies sich die Identifikation durch die phänotypische Methode als schwierig, während die Identifikation durch PCR weiterhin zuverlässig möglich ist. Dies begründet sich darin, dass für das Wachstum in Kultur lebende Zellen benötigt werden, während für die PCR-Methode das Genmaterial auch nicht lebender oder inaktiver Zellen amplifiziert und so analysiert werden kann.

Dies zeigt den Vorteil der molekularbiologischen Techniken zur Differenzierung der *Malassezia*-Spezies gegenüber den biochemischen und den phänotypischen Alternativen. Dennoch ist in vielen klinischen Laboren eine einfache, verlässliche und kosteneffektive Methode notwendig (Kaneko 2007).

Hier zeigt sich die Bedeutung des neu entwickelten Differenzierungssystems von Gutsuz et al. mit modifizierter Fettsäureauxanografie. Diese ist im Gegensatz zur herkömmlichen Tween®-Auxanografie in der Lage, bisher nicht einzuordnende Wildstämme einer Spezies zuzuordnen und zudem einfach in Herstellung, Durchführung und Auswertung.

Im Allgemeinen erwiesen sich die molekularbiologischen Verfahren dennoch im Gegensatz zu den konventionellen Methoden als weniger zeitaufwändig, zuverlässiger und eindeutiger zu interpretieren (Gupta 2004). Ungeachtet dessen unterscheiden sich die verschiedenen molekularbiologischen Methoden in ihren Vor- und Nachteilen.

Das PCR-Fingerprinting kann erfolgreich zur Typisierung von *Malassezia*-Spezies eingesetzt werden. Obwohl die Isolation einiger Stämme beschwerlich ist und nicht alle PCR-Primer deutliche DNA-Banden-Muster erbracht haben, wie die des *M. furfur* und des *M. sympodialis* (Versalovic 1991; Belkum 1994), konnten einige epidemiologisch nützliche Untersuchungen entwickelt werden, indem mehrere prokaryotisch wiederholt übereinstimmende Primer wie ERIC oder REP eingesetzt wurden. Pilot-Experimente schlossen eine geringe Anzahl von *Malassezia*-Stämmen ein, welche deutlich machten, dass die Anwendung von einzelnen REP- oder ERIC-Primern nicht ausreichend charakterisiert werden können. Die Kombination der Primer ERIC, IR und ERIC-2 in einer einzigen Reaktion erbrachte hingegen eine genügend

hohe Übereinstimmung der DNA-Vielfalt zwischen den verschiedenen Stämmen (Belkum 1994).

Die direkte rRNA-Sequenzierungs-Methode, angewandt von Guillot und Gueho (Guillot 1995), ist für die Routineanalyse und -diagnostik nicht geeignet, da sie sehr zeitaufwändig ist und relativ große Mengen an RNA voraussetzt (Gupta 2000).

Durch die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese hingegen kann zuverlässig zwischen sieben *Malassezia*-Spezies unterschieden werden (Gupta 2000).

Mit Hilfe der RAPD („randomly amplified polymorphic DNA“)-Analyse ist es möglich, in verschiedene *Malassezia*-Spezies zu unterteilen. Dennoch erwies diese sich in Bezug auf die Identifikation der einzelnen Spezies aufgrund der variierenden Ergebnisse in der Heterogenität als unzuverlässig (Boekhout 1998b).

Die Karyotypisierung ist eine Methode, die sich als sehr widerstandsfähig erwiesen hat. Auf der anderen Seite ist sie zeitaufwändig und sehr laborintensiv (Gupta 2000).

Die Methode nach dem amplifizierten Fragmentlängen-Polymorphismus (AFLP) kann sieben Spezies voneinander unterscheiden. Außerdem ist auch eine Differenzierung innerhalb der Spezies *M. furfur* möglich (Theelen 2001).

Durch das DGGE (Denaturing Gradient Gel Elektrophoresis)-Verfahren ist ein leistungsfähiges Hilfsmittel für komplexe klinische Proben gegeben und kann so die verschiedenen *Malassezia*-Spezies differenzieren. Sie besitzt aber einen hohen technischen Anspruch und ist daher für die Routinediagnostik nicht geeignet (Theelen 2001).

Anhand der ribosomalen DNA-Analyse der D1/D2-Region können alle *Malassezia*-Arten korrekt identifiziert werden. Sie erlaubt eine hohe intraspezifische Auflösung der eng miteinander verwandten Sequenzen (Guého 1995).

Die Analyse der IGS-rDNA hingegen zeigt höhere Abweichungen als andere Regionen oder Untereinheiten und weist erhebliche intraspezifische Ungleichheiten auf (Sugita 2003).

Anhand der PCR-RFLP Methode können elf verschiedene *Malassezia*-Spezies differenziert werden. Es ist möglich, sowohl Gattung und Standardstämme als auch klinische Isolate zu identifizieren (Mirhendi 2005).

Die tFLP-Methode ermöglicht die Prüfung der Ökonomie von *Malassezia*-Hefen, unabhängig von ihrer Subkultur. Diese Technik umfasst die fluoreszierende Nested-PCR der ITS I- und ITS II-Region ribosomaler Gen-Cluster, d.h. einer Gruppe von benachbarten Genen ähnlicher Funktion. So können durch die eindeutige Fragmentlänge der ITS1-Region alle *Malassezia*-Hefen differenziert werden (Gemmer 2002).

Mittels Analyse der Nukleotidsequenz des Chitin-Synthase 2-Gens untersuchten Kano et al. 1999 die sieben damals bekannten *Malassezia*-Spezies *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M.*

pachydermatis, *M. restricta*, *M. slooffiae* and *M. sympodialis* auf phylogenetische Verwandtschaft und entdeckten, dass trotz mehr als 95%-iger Ähnlichkeit jede Spezies sich genetisch von den anderen in Bezug auf diese Gensequenz unterschied (Kano 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse der DNA-Sequenzen von nukleär ribosomalen internalen transkribierten Spacer-1-Regionen (ITS1) nach Makimura et al. (2000) durchgeführt, um die *Malassezia*-Hefen zu differenzieren. Anhand der ITS1-Region ist eine Unterscheidung der sieben anfänglich erwähnten Spezies möglich. Auch neue Arten wurden aufgrund einer genetischen Variation dieser Region entdeckt; wie z. B. *M. dermatis* (Sugita 2002). Für diese Methode wurden universelle Eukaryonten-Primer aus der ITS-Region und spezifisch entwickelte Primer aus der veröffentlichten Teilsequenz der großen Untereinheiten (LSU) für ribosomale Gene der *Malassezia*-Spezies eingesetzt. ITS1 ist zwischen 18S und 5.8S rDNA lokalisiert und 162 bis 266 Basenpaare lang. Die ITS1-Region erwies sich als nützlich, um zwischen engen taxonomischen Verwandtschaften zu unterscheiden (Berbee 1995, Carbone 1993, LoBuglio 1993) und um mit ihrer Hilfe, besonders in der Mykologie, verschiedene phylogenetische Studien durchzuführen (Attili 1998, Makimura 1998, Uijthof 1998, Wedde 1998). Außerdem zeigte sie sich in der Anwendung als schnell und zuverlässig (Boekhout 1998b), da sich die ITS-Region durch eine hohe Variabilität unter den Chromosomensätzen der unterschiedlichen Pilzspezies auszeichnet (Landing 2009). So konnte mit Hilfe dieser zuverlässigen, etablierten Methode nach Makimura et al. in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das von Gutsuz et al. entwickelte Differenzierungssystem aufgrund der Kongruenz im Vergleich der Referenzstämme mit einer Übereinstimmungsrate von 94 % und der Wildstämmen von 92 % eine gute Alternativmethode zu den molekularbiologischen Verfahren darstellt. Die Bedeutung der ITS-Region und ihre Funktion werden im Folgenden diskutiert. Die ITS-Region ist im rDNA-Komplex aller eukaryontischen Zellen enthalten. Der gesamte rDNA-Komplex beinhaltet vom 5' zum 3'-Ende die intergenetische Platzhalter-Region IGS. Sie enthält den externalen transkribierten Spacer ETS1 am 5'-Ende und ETS2 am 3'-Ende, zusammen mit variablen Lokalisationen des 5S rDNA-Gens, des 18S rDNA-Gens, der ITS1-Region, des 5.8S-Gens, der ITS2-Region und des 28S rDNA-Gens (Lott 1993). Die ITS2-Region befindet sich zwischen 5.8S und 28S während die in der vorliegenden Arbeit verwendete ITS1-Region zwischen 18S und 5.8S liegt. Während der frühen Transkription im Zellkern enthält der anfängliche Präkursor der RNA-Formation die Nukleotide für die 5'-ETS1/18S/ITS1/5.8S/ITS2/28S/ETS2-3' Untereinheit, bezeichnet als 35S nach 45S rDNA Transkriptionseinheit. Diese genomische Einheit, welche die Gene enthält, die für die RNA-Formation ausschlaggebend sind, markiert den rDNA-Komplex des Pilzgens (Yeh 1990).

Dieser gesamte Gen-Komplex mit konservierten und variablen Nukleotidsequenzen fungiert aufgrund seiner Präsenz in allen eukaryontischen Zellen als Referenz für evolutionäre Abweichungsstudien. Außen vor bleibt das 5S-Gen, da es während der Transkription deutlich anders im Vergleich zu den anderen rDNA-Produkten prozessiert wird. Viel mehr spielt es eine Rolle bei der Formation von Ribosomen (Szymanski 2000).

Mit Hilfe der 18S-Region, welche variable und konservierte Sequenzen enthält, können durch Sequenzvariationen innerhalb dieser Regionen taxonomische Beziehungen der Hauptgruppen abgeschätzt und den Gattungen und Arten zugeordnet werden (Einsele 1997). Nachteile für den Gebrauch der 18S-Region zeigen sich in der Größe von über 1800 Basenpaaren, da man für die Vergleichsanalyse einen hohen Anteil von Basen benötigt. Außerdem besteht eine relative Sequenzhomologie innerhalb dieser Region zwischen den Pilzarten. Die 5.8S-Region ist hingegen nur 160 Basenpaare lang und innerhalb der großen Organismengruppen hoch konserviert. Infolge dieser kleinen Größe und der konservierenden Eigenschaft ist sie für phylogenetische Studien zur Klassifikation von Pilzarten nicht geeignet (White 1990).

Das 28S-rDNA-Gen mit einer Größe von 3400 Basenpaaren innerhalb der Pilzspezies enthält sowohl variable als auch konservierte Sequenzregionen. Der variable Bereich der großen ribosomalen Untereinheit kann zum Vergleich von hoher taxonomischer Ebene zur Speziesebene herangezogen werden. Da viele Sequenzen des 28S-Gens unter den Organismengruppen konserviert sind, stellt sich der Nutzen für die Speziesidentifikation als fraglich dar (Hennequin 1999, Kurtzmann 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte ITS1-Region zeigt hingegen umfassende Sequenzunterschiede innerhalb der Hauptgruppen von Mikroorganismen und sogar innerhalb der Spezies derselben Hauptgruppe. Die Sequenzgröße jeder Region variiert von 1000 Basenpaaren in humanen Zellen bis hin zu unter 300 Basenpaaren bei einigen Hefen (Gonzalez 1990, Joseph 1999). Ebenso zeigte sich, dass diese Spacer-Region für die frühe Transkription während des rRNA-Prozesses von Bedeutung ist. Viele Studien demonstrierten, dass genügend Sequenzunterschiede unter den Pilzen bestehen, um anhand der ITS1-Region verschiedene Spezies identifizieren zu können (Affes 2009, de Bellis 2010, Koike 2013, Sugita 2005a, Sugita 2003c). Selten gibt es Fälle, in denen eine Sequenzübereinstimmung innerhalb der ITS-Region von mehr als 99 % zwischen einzelnen Spezies besteht. In diesen Fällen ist es problematisch, alleine mittels Sequenzanalyse die Spezies zu differenzieren (Gaskell 1997). Zusätzlich zeigen einige wenige Spezies keine ausreichende Variabilität, um sie mit Hilfe alleiniger Sequenzanalyse zuordnen zu können (O'Donnell 1992, Okeke 1998). Die Sequenzunterschiede unter den Pilzstämmen und die Sequenzähnlichkeiten zwischen den Arten können Fehlbestimmungen, welche auf alleiniger phänotypischer Charakterisierung

basieren oder falsch deklarierte taxonomische Zuordnungen, aufdecken. Diese genotypischen Unterschiede innerhalb der ITS-Regionen haben sich so als wertvoll für die Typisierung der Arten erwiesen (Lin 1995). Mehrere Beispiele wurden diesbezüglich diskutiert, um die Zuverlässigkeit der ITS-Region als molekulares Ziel für die Zuordnung und Charakterisierung von Pilzstämmen nach Art und Geschlecht zu demonstrieren (Iwen 2002). Makimura et al. demonstrierte schließlich die Anwendbarkeit der ITS1-Region für die Identifikation von *Malassezia*-Spezies (Makimura 2000). Der Einsatz dieser Methode erfolgte in dieser Arbeit zur Überprüfung der korrekten Speziesidentifizierung durch u.a. das modifizierte Auxanogramm.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des durch Gutsuz et al. zur *Malassezia*-Spezies-identifikation entwickelten Testsystems der modifizierten Fettsäure-Auxanografie als konventionelles Bestimmungsverfahren mit denen der ITS1-rDNA-Sequenzierung als molekularbiologischer Referenzmethode verglichen. Dazu wurde die Übereinstimmungsrate beider Verfahrensvarianten durch die Analyse von 17 Referenzstämmen und 26 Wildkulturen ermittelt. Bei den Referenzstämmen resultierte eine Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren wie in Bezug auf den Vergleich mit den bei den Referenzstämmen vorbekannten *Malassezia*-Spezies von 94,1 % (16 von 17), während bei den Wildstämmen 92,3 % (24 von 26) im Ergebnis identisch waren. Die Resultate zeigen, dass mit Hilfe der Methode von Gutsuz et al. die wahrscheinliche Identifikation von klinisch wie phylogenetisch relevanten *Malassezia*-Hefen möglich ist. Es kann somit als Alternative zur Bestimmung der Spezies herangezogen werden, da in der Routinelabordiagnostik nicht immer molekularbiologische Verfahren zur Verfügung stehen.

Auch bei Fehlen von kostenintensiven High-Tech-Geräten kann das von Gutsuz et al. entwickelte modifizierte Fettsäureauxanogramm eine geeignete Alternativmethode zu molekularbiologischen Verfahren sein. In tropischen Regionen kommt es zu einem gehäuftem Auftreten der Pityriasis versicolor (Mayser 2012) und in der Regel stehen dort nur sehr eingeschränkte finanzielle Ressourcen zur Verfügung. Auch besitzen viele Labore in Kliniken aus Kostengründen kein Equipment für die molekularbiologische Analyse (Kaneko 2011), daher sind auch dort alternative Methoden zur Identifizierung von Nutzen.

Wesentlich für die Anwendung der Art diagnostischer Verfahren ist die Kenntnis mit den verschiedenen *Malassezia*-Spezies assoziierter Erkrankungen.

Die Pityriasis versicolor (PV) zum Beispiel steht im Zusammenhang mit der Gattung *Malassezia*. Dies zeigt sich zum einen durch die einheitlichen Beschreibungen der Hefen aus den verschiedenen PV-Läsionen. Außerdem ist es wahrscheinlicher eine *Malassezia* positive Kultur aus einer Probe einer PV-Hautläsion zu gewinnen, als aus einer Probe makroskopisch

gesunder Haut desselben Individuums (Prohic 2007). Ursprünglich war die PV mit der Spezies *M. globosa* assoziiert (Crespo 2000, Crespo-Erchiga 2006), z.T. wurden auch andere *Malassezia*-Spezies nachgewiesen (Miranda 2006), aber aktuelle epidemiologische Daten erlauben aufgrund des Fehlens eindeutiger Virulenzfaktoren, die auf diese Spezies begrenzt sind, keinen endgültigen Rückschluß (Hort 2011). Somit ist die Beziehung zwischen der PV und der Spezies *Malassezia*, trotz des gehäuftten Auftretens dieser Erkrankung und der bewiesenen Assoziation mit *Malassezia*, noch immer unklar (Gaitanis 2012). Das Ziel einer Behandlung der PV, sei es systemisch oder lokal, besteht nicht darin, die Hefen-Population gänzlich zu beseitigen, sondern wieder eine symbiotische Dynamik herzustellen (Gaitanis 2012). Die Behandlung der PV sollte zeitnah mit Antimykotika und anschließender Ultraviolett-Therapie erfolgen, um eine Reifung der existierenden Melanosomen zu erreichen und eine Repigmentierung zu erzeugen. Die Behandlung depigmentierter Läsionen erwies sich als schwierig (Thoma 2005).

Eine weitere Erkrankung, die durch *Malassezia* ausgelöst wird, ist das seborrhoische Ekzem. Die Rolle, die die Spezies bei der Pathogenese spielt, bekam in den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine neue Bedeutung. Hier wurde gezeigt, dass der gemeinsame Nenner der vielen Behandlungsregime ihre antifungale Aktivität ist (Shuster 1984). Die Prävalenz dieser Erkrankung ist mit 11,6 % nach einer amerikanischen Studie sehr hoch. In einer weiteren Studie diagnostizierten Dermatologen das Vorkommen bei Männern in 2,6 % und bei Frauen in 3,0 % der untersuchten Fälle (Naldi 2009). Bei der medikamentösen Behandlung werden oft Azole eingesetzt. Bisweilen wurden hier Resistenzen beobachtet. Diese sind am ehesten auf Variationen der kürzlich beschriebenen *M. globosa* Azol-metabolisierenden CYP51-Enzyme zurückzuführen (Kim 2011). Weitere kürzlich erhobene Daten brachten *Malassezia* in hohem Maße mit der Pathogenese des seborrhoischen Ekzems und der von Kopfschuppen in Verbindung. Trotz der globalen Verbreitung und der hohen ökonomischen Belastung, die durch diesen Hautzustand verursacht wird, wurden bisher nur begrenzt Untersuchungen durchgeführt, die das exakte Wissen zur Pathogenese der Spezies *Malassezia* verbessern. Trotzdem ist das seborrhoische Ekzem ein exzellentes Modell für weitere Untersuchungen, um das Wissen zum Spezies- und Stamm-spezifischen Metabolismus, des immunogenetischen Potenzials der Hefen, sowie der genauen Wirtsempfindlichkeit zu erweitern (Gaitanis 2012). Auch hierzu ist eine zuverlässige Methode zur Spezies Bestimmung von Bedeutung, um die Pathogenese besser verstehen zu können und damit die Therapie zu optimieren.

Auch bei der Pathogenese des atopischen Ekzems spielt die Gattung *Malassezia* eine Rolle. Beim atopischen Ekzem besteht ein Defekt der epidermalen Barrierenfunktion (Cork 2009).

Hierbei handelt es sich um das Stratum corneum, einer dünnen Hautschicht, die die ganze Körperoberfläche bedeckt. Konstitutionelle genetische Defekte im Aufbau dieser Barriere können durch die Aktivität eines symbiotischen Organismus, wie der der *Malassezia*-Hefen, verstärkt werden. Die Produktion von Proteinasen und Phospholipasen wurden für die, hauptsächlich bei Tieren vorkommenden, *M. pachydermatis*-Isolate bewiesen und eine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung bei Hunden aufgezeigt (Machado 2010). *Malassezia*-Hefen besitzen Spezies- und Stamm-spezifische Eigenschaften, die eine charakteristische Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung spielen. So liegt die Anwesenheit von Enzymmechanismen nahe, welche den Niedergang der bereits beeinträchtigten Lipidbestandteile der atopischen epidermalen Barriere unterstützt (Dawson 2007). *Malassezia* Hefen stimulieren die Keratinozyten verschiedene Zytokine zu produzieren. Die Art und Weise hängt von der Spezies ab. Werden gesund aussehende atopische Hautstellen mit *M. sympodialis* ATCC42132 Extrakt getestet, zeigt sich eine ähnliche Genexpression wie in der erkrankten Haut (Saaf 2008). Dieses Profil zeigt in beiden Proben sowohl das Wachstumsniveau in der Ausbreitung der inflammatorischen- und immunassoziierten Gene als auch die Downregulation der Gene, die mit der Lipidproduktion assoziiert sind. Dieses macht deutlich, dass zumindest *M. sympodialis* in der Lage ist, bei suszeptiblen Individuen das Krankheitsprofil eines atopischen Ekzems hervorzurufen (Gaitanis 2012). Die Verwicklung der *Malassezia* Hefen in das Krankheitsbild des atopischen Ekzems ist gegenwärtig unter intensiver Beobachtung und mehrere Studien wurden benötigt, um die Rolle der Gattung *Malassezia* in der Verursachung und der Verschlimmerung dieser Krankheit zu verstehen. Außerdem zeigt die beobachtete Empfindlichkeit gegenüber der immunologischen Antwort auf *Malassezia* eine enge Assoziation von Haut und ihrer vorherrschenden eukaryoten Symbiose (Gaitanis 2012).

Auch die *Malassezia* Follikulitis ist ein Krankheitsbild, bei dem die Hefen eine entscheidene Rolle spielen. Der Beweis der Anwesenheit einer *Malassezia*-Spezies zeigt sich in der Form von kleinen kugeligen bis ovalen Hefeorganismen ohne die regelhafte Beobachtung von Hyphen (Potter 1973). Weiter scheint es einige Prädispositionen in der Entwicklung der *Malassezia* Follikulitis mit anderen *Malassezia*-assoziierten Erkrankungen zu geben, wie der PV und der seborrhoischen Dermatitis (Faergemann 1986). Es besteht ein gehäuftes Vorkommen in heißen und feuchtwarmen Umgebungen, außerdem wird von einer Koexistenz bei 65% der Aknepatienten auf den Philippinen (Jacinto-Jamora 1991) und von einem Vorkommen bei 1-1,5 % ambulanter dermatologischer Patienten in China berichtet (Bulmer 2008). Weiter wurde die *Malassezia* Follikulitis in Form einer Epidemie auf Intensivstationen (Archer-Dubon 1999) und bei Herztransplantationsempfängern (Rhie 2000) beobachtet. Die

Pathogenese dieser Erkrankung ist noch nicht ganz geklärt, aber es konnte gezeigt werden, dass die normale Hautflora die Haarfollikel infiziert und somit zur Entwicklung der Follikulitis führt (Akaza 2009). Dem zu Folge sind die am häufigsten identifizierten Spezies bei dieser Erkrankung *M. restricta*, *M. globosa* und *M. sympodialis*, entweder in Kombination oder einzeln (Akaza 2009).

Eine weitere wichtige, mitunter auch durch *Malassezia*-Spezies ausgelöste Erkrankung ist die Sepsis. Zum Beispiel war *M. pachydermatis* Auslöser einer Fungämie auf einer neonatalen Intensivstation bei Frühgeborenen mit leichtem Geburtsgewicht und weiteren Komorbiditäten. Diese Kinder bekamen außerdem eine lipidreiche enterale Ernährung (Chryssanthou 2001). Dabei wurde *M. pachydermatis* entweder aus der Blutkultur, dem Tracheal-, Augen- oder Nasensekret oder aus dem Urin nachgewiesen. Außerdem konnte mit Hilfe der molekularbiologischen Methode RAPD *M. pachydermatis*-Stämme auf der Oberfläche von Inkubatoren festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Spezies trotz standardisierten Hygieneprozeduren bis zu drei Monaten auf der Oberfläche persistieren kann. Daraufhin wurde ein neues Prozedere für die Hygiene des Klinikpersonals, die mit Neugeborenen arbeiten, umgesetzt (Chang 1998). Festgestellt wurde an dieser Stelle, dass die höchste Rate infizierter Hände von Hundebesitzern resultierte. Die durch die Spezies *Malassezia pachydermatis* ausgelösten septischen Krankheitsbilder bei Erwachsenen zeigen hingegen eine unterschiedliche klinische Präsentation und können Patienten mit unterschiedlichem Ausmaß an Immunsuppression befallen. Kürzlich erhobene Daten zeigen keine hohe Prävalenz, obwohl bewiesen ist, dass Infektionen durch dieses Agens verursacht worden sind. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass viele durch *Malassezia* ausgelöste Sepsen nicht diagnostiziert werden (Gaitanis 2012).

Dass die Differenzierung der Spezies allgemein für den therapeutischen Erfolg der durch *Malassezia* ausgelösten Krankheiten von Bedeutung ist, wird im Folgenden anhand der unterschiedlichen Empfindlichkeit der verschiedenen Spezies auf unterschiedliche Therapeutika erläutert.

Die Ergebnisse von *in vitro*-Suszeptibilitätsstudien haben Unterschiede in der Empfindlichkeit von sieben *Malassezia*-Spezies gegenüber Ketoconazol, Voriconazol, Itraconazol und Terbinafin gezeigt. Stämme von *M. furfur*, *M. globosa*, und *M. obtusa* waren unempfindlicher gegenüber Terbinafin als andere Spezies, während *M. sympodialis* als hoch suszeptibel imponierte (Gupta et al. 2000).

Weiter wird das Wachstum von *M. pachydermatis* durch Polidocanol bereits bei Konzentrationen von 0,05 % gehemmt, während für die Behandlung weiterer non-*furfur*-Stämme bereits Konzentrationen von 0,5 bis 0,75 % benötigt werden. *M. furfur* hingegen ist

selbst bei einer bis zu zehnfach höheren Konzentrationen dieses Medikaments resistent (Mayser et al. 1997b).

Des Weiteren kann durch die orale Gabe von Terbinafin nur die Spezies *M. sympodialis* therapiert werden (Leeming et al. 1997).

In einer großen dermatologischen Studie von Nenoff et al. 2007 wurden lokal und systemisch applizierbare Antimykotika (Fluconazol, Ketoconazol, Voriconazol, Itraconazol, 5-Flucytosin und Amphotericin B) hinsichtlich ihrer In-vitro-Aktivität gegenüber *Malassezia* getestet. Zum Einsatz kamen insgesamt 81 *Malassezia*-Stämme (Patientenisolate sowie Referenzstämme), die aufgrund konventioneller biochemischer Differenzierung sowie mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IRS) verschiedenen Spezies zugeordnet werden konnten.

Die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) basierte auf einem selbst entwickelten Mikrodilutionstest. Dazu wurden rehydratisierte Antimykotika mit standardisierten Hefezellsuspensionen aufgelöst.

Die MHK-Werte der einzelnen *Malassezia*-Spezies variierten innerhalb eines Antimykotikums. Der Vergleich zwischen den eingesetzten Wirkstoffen erbrachte signifikante Unterschiede. Wie erwartet, hemmten die Azolantimykotika (Fluconazol, Ketoconazol, Voriconazol und Itraconazol) das Wachstum *in vitro* schon bei niedrigen Konzentrationen. Voriconazol, Itraconazol und Ketoconazol hemmten das Wachstum *in vitro* am stärksten, was mit anderen Studien übereinstimmt. Offensichtlich gibt es Unterschiede der In-vitro-Empfindlichkeit der verschiedenen *Malassezia*-Spezies. *Malassezia furfur* ist am wenigsten empfindlich gegenüber mehreren Antimykotika, dagegen sind *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa* und *Malassezia obtusa* deutlich empfindlicher, d.h. sie wiesen niedrigere MHK-Werte auf (Nenoff 2007).

Hätte man nun also eine einfache Differenzierungsmöglichkeit im Routinelabor oder gäbe es spezielle Therapieempfehlungen basierend auf epidemiologischen Untersuchungen und klinischen Wirksamkeitsstudien, wäre die Behandlung der *Malassezia*-assoziierten Erkrankungen vermutlich effizienter gestaltbar.

Die eingangs gestellten Fragen sind daher wie folgt zu beantworten:

Die phänotypische Differenzierungsmethodik mit u.a. modifizierter Fettsäureauxanografie nach Gutsuz et al. stellt im Routinelabor eine relativ zuverlässige Methode zur Differenzierung der in der vorliegenden Arbeit überprüften *Malessezia*-Spezies dar, die allerdings nicht die Zuverlässigkeit einer PCR-basierten Methode wie der als Referenzverfahren verwendeten ITS1-rDNA-Sequenzierung nach Makimura et al. (2000) erreichen kann.

Eine klinische Relevanz der *Malassezia*-Hefen ist wie oben ausführlich dargestellt human- und veterinärmedizinisch vorhanden. Humanpathologisch betrachtet sind interindividuell wie intraindividuell variable Dispositionen wie Krankheitsverläufe bis zu vital-bedrohlichen septischen Krankheitsbildern möglich, womit bei zum Teil verschiedenartiger Therapie die Notwendigkeit einer zuverlässigen Spezies-Identifizierung gegeben ist. Im Spektrum aller Pilzinfektionen dominieren allerdings bei schweren Krankheitsbildern auf Intensivstationen andere Pilze wie beispielsweise *Candida* ssp. und *Aspergillus* ssp. deutlich.

6. Zusammenfassung

Malassezia-Hefen sind die Ursache für eine Reihe dermatologischer Erkrankungen wie z.B. der Pityriasis versicolor. Ihre Klassifikation ist in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt. Verschiedene phänotypische und molekularbiologische Nachweismethoden wurden zur Differenzierung unterschiedlicher Stämme entwickelt.

Anhand dieser Studie wurde die Übereinstimmungsrate der Zuordnungen von *Malassezia*-Hefen zwischen der etablierten molekularbiologischen Methode nach Makimura et al. (2000) und der phänotypischen Differenzierungsmethodik von Gutsuz et al. mit modifizierter Fettsäure-Auxanografie, der Spaltung von Esculin, der Assimilation von Cremophor EL[®], der Assimilation von 1b-Agar, einer Negativkontrolle auf Selektivagar für pathogene Pilze, einer Positivkontrolle auf modifiziertem Dixon-Agar, der Katalasereaktion und der Mikroskopie bestimmt sowie die Anwendbarkeit der modifizierten Fettsäure-Auxanografie nach Gutsuz et al. überprüft. Verwendet wurden 17 Referenzstämme sowie 26 aus Bürstenabstrichen erhaltene Wildkulturen der Spezies *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa* und *M. dermatis*, welche anhand beider Verfahren den verschiedenen Spezies zugeordnet wurden. Die Übereinstimmung der Wildkulturen betrug 92 %, die der Referenzstämme 94 %. In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die phänotypische Differenzierungsmethodik von Gutsuz et al. für die Identifikation von wichtigen *Malassezia*-Hefen anwendbar ist. So ist die Differenzierung von *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* und *M. obtusa* auxanografisch möglich sowie die Zuordnung von *M. slooffiae*, *M. dermatis* und *M. globosa* unter zusätzlicher Einbeziehung morphologischer Kriterien und der Katalasereaktion. Diese phänotypische Methodik bietet eine bedeutsame Alternative zu molekularbiologischen Methoden, besonders im Hinblick auf Entwicklungsländer, welche meist nicht über High-Tech-Geräte verfügen. Außerdem stellt die neu entwickelte Fettsäureauxanografie von Gutsuz et al. ein kostengünstiges Verfahren dar, welches auch im Routinelabor angewendet werden kann.

Weiter wird in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Differenzierung der *Malassezia*-Hefen für die Behandlung von *Malassezia*-assoziierten Krankheitsbildern eine entscheidene Rolle spielt. Außerdem werden die Vor- und Nachteile molekularbiologischer Nachweisverfahren und der Nutzen und die Zuverlässigkeit der von uns zur Differenzierung verwendeten ITS-1-Region aufgezeigt.

7. Summary

Malassezia yeasts are causative for several dermatological diseases such as pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis. In the last years the classification of *Malassezia* yeasts has come to the fore. Different phenotypical and molecularbiological methods were developed for the differentiation of several strains, some of them recently newly-discovered. On the basis of this study the rate of conformity of *Malassezia* yeasts between the established molecularbiological method by Makimura et al. (2000) and a phenotypical methodology for differentiation of *Malassezia* developed by Gutsuz et al. with modified fatty acid auxanography, esculin cleavage, assimilation of Cremophor EL[®] agar, assimilation of 1b-agar, a negative control on selective agar for pathogenic fungi, a positive control on modified dixon agar, catalase reaction, microscopy were assessed, as well as the applicability of the modified fatty acid auxanography by Gutsuz et al. in general.

17 reference strains and 26 field strains of the species *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa* and *M. dermatis* were assigned to the different species by both methods and the results were compared. The rate of conformity of the field strains was 92 %. 94 % of the reference strains were accordingly determined.

In this study it was shown by verification with a molecularbiological method that the phenotypical methodology for differentiation of *Malassezia* by Gutsuz et al. is applicable for the identification of all verified *Malassezia* yeasts. The determination among *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* and *M. obtusa* is auxanographically possible as well as the classification of *M. slooffiae*, *M. dermatis* and *M. globosa* with additional implication of morphological criteria and catalase reaction.

The phenotypical method poses an appropriate alternative to the molecularbiological methods, especially in view of developing nations, which often do not have any high-tech-equipment.

Moreover the new developed fatty acid auxanography by Gutsuz et al. is a cost-effective procedure and easy to apply in routine laboratory. Furthermore the present research study discusses the relevance of *Malassezia* yeasts for various dermatomycoses, advantages and disadvantages of molecularbiological methods and the reliability of the accordance ITS-1-region as a feature for differentiation.

8. Literaturverzeichnis

Affes M, Salah SB, Makni F, Sellami H, Ayadi A (2009):

Molecular identification of *Malassezia* species isolated from dermatitis affections

Mycoses 52(3): 251-256

Aizawa T, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A (2001):

The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats

Med. Mycol. 39:329-334

Akaza N (2010):

Cutaneous *Malassezia* microbiota in atopic dermatitis patients differ by gender and body part

Dermatol. 221: 253-260

Akaza N (2009):

Malassezia folliculitis is caused by cutaneous resident *Malassezia* species

Med. Mycol. 47: 618-624

Altmeyer P, Dirschka TH, Hartwig R (Juni 1998):

Klinik Leitfadens Dermatologie

Gustav Fischer Verlag, 1. Auflage, 261

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990):

Basic local alignment search tool

J. Mol. Biol. 215: 403-410

Alves EV, Martins JE, Ribeiro EB, Sotto MN (2000):

Pityrosporum folliculitis: renal transplantation case report

J. Dermatol. 27: 49-51

Anthony, RM, SA Howell, L Pinters (1994):

Application of DNA typing methods to the study of the epidemiology of *Malassezia pachydermatis*.

Microb. Ecol. Health Dis. 7: 161-168

Archer-Dubon C (1999):

An epidemic outbreak of *Malassezia* folliculitis in three adult patients in an intensive care unit: a previously unrecognized nosocomial infection

Int. J. Dermatol. 38: 453-456

Arikan S, Rex JH (2000):

New agents for treatment of systemic fungal infections

Emerging Drugs 5: 135-160

Attili DS, De Hoog DS, Pizzirani-Kleiner AA (1998):

rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis

Med. Mycol. 36: 219-225

Barfatani M, Munn RJ, Schjeide OA (1964):

An ultrastructure study of *Pityrosporum orbiculare*.

J. Invest. Derm. 43: 231-233

Belkum A, Boekhout T, Bosboom R (1994):

Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing.

J. Clin. Microbiol. 32: 2528-2532

Benham RW (1939):

The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*- A lipophilic fungus

J. Invest. Dermatol. 2: 187-203

Berbee ML, Yoshimura A, Sugiyama J, Taylor JW (1995):

Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data

Mycologia 87: 210-222

Bergbrant IM, Faergemann J (1989):

Seborrheic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a cultural and immunological study

Acta. Derm. Venerol. 69: 332-335

Bieber T (2008):

Atopic dermatitis

N. Engl. J. Med. 358: 1483-1494

Boekhout T, Kamp M, Gueho E (1998a):

Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic epidemiological implications

Syst. Appl. Microbiol. 17: 147-153

Boekhout T, Kamp M, Gueho E (1998b):

Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD

Med. Mycol. 36: 365-372

Boekhout T, Gueho E (2003):

Basidiomycetous yeast. In: Pathogenic Fungi in Humans and Animals

(Howard, DH, ED.), 2nd edn, pp 537-542, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

Borodina T A, Lehrach H., Soldatov A V (2003):

DNA purification on homemade silica spin-columns.

Anal Biochem., Band 321(1): 135-7. PMID 12963065

Brdiczka D, Krebs W (1973):

Localization of enzymes by means of proteases

Biochem. Biophys. Acta. 297: 203-212

Breathnach AS, Gross M, Martin B (1976):

Freeze-fracture replications of cultured *Pityrosporum orbiculare*

Sabouraudia 14: 105-113

Buechner S (2014):

Multicenter, double-blind, parallel group study investigation the non-inferiority of efficacy and safety of a 2 % miconazole nitrate shampoo in comparison with a 2 % ketoconazole shampoo in treatment of seborrhoeic dermatitis of the scalp

J. Dermatolog. Treat: 25(3):226-31.

doi: 10.3109/09546634.2013.782092. Epub 2013 May 21

Bulmer GS, Pu XM, Yi LX 2008:

Malassezia folliculitis in China

Mycopathologia 165: 411-412

Cabañes FJ, Theelen B, Castellà G, Boehhout T (2007):

Two new lipid-dependent *Malassezia*-species from domestic animals

FEMS Yeast Res. 7 : 1064-1076

Cabañes FJ, Vega S, Castellà G (2011):

Malassezia cuniculi sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin.

Med Mycol. 49(1): 40-8.

Calman KC, Muir AV, Milne JA, Young H (1970):

Survey of the distribution of steroid dehydrogenases in sebaceous glands of human skin

Br. J. Derm. 82: 657

Canteros CE, Rivas MC, Lee W, Perrotta D, Bosco-Borgeat ME, Davel G (2007):

Concordance between phenotypical features and PCR-REA for the identification of *Malassezia* spp.

Rev. Iberoam Micol. Dec 31 24(4): 278-82

Carbone I, Kohn LM (1993):

Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer1 of the sclerotiniaceae

Mycologia 85: 415-427

Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Latrofa MS, Otranto D (2011):

Advances in the identification of *Malassezia*.

Mol. Cell. Probes 25(1): 1-7.

Chang HJ (1998):

An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers pet dogs

N. Engl. J. Med. 338: 706-711

Chiou CC, Groll AH, Walsh TJ (2000):

New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer

The Oncologist 5: 120-135

Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B (2001):

Malassezia pachydermatis fungaemia in a neonatal intensive care unit

Acta. Paediatr. 90: 323-327

Clemmensen O, Hjorth N (1983):

Treatment of Dermatitis of the head and neck with Ketoconazole in patients with type I sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*

Semin. Dermatol. 2: 26-29

Cork MJ, 2009:

Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis

J. Invest. Dermatol. 129: 1892-1908

Cotterill JA, Cunliffe WJ, Williamson B, Bulusu L (1972):

Age and sex variation in skin surface lipid composition and sebum excretion rate

Br. J. Derm. 87: 333-340

Crespo EV, Hay RJ (2010):

Pityriasis versicolor and other *Malassezia* skin disease

P 175-199 In Boekhout T, Gueho E, Mayser P, Velegraki A, editors. (ed), *Malassezia* and the skin. Science and clinical practice. Springer, Berlin, Germany

Crespo EV, FlorencioVD (2006):

Malassezia yeasts and pityriasis versicolor.

Curr. Opin. Infect. Dis. 2006; 19(2): 139-47

Crespo EV, Ojeda MA, Vera CA, Crespo EA, Sanchez FF (2000):

Malassezia globosa as the causative agent of pityriasis versicolor

Br. J. Dermatol. 143: 799-803

Crespo EV, Ojeda MA, Vera CA, Crespo EA, Sanchez FF, Gueho E (1999a):

Mycology of pityriasis versicolor

J. Mycol. Med. 9: 143-148

Crespo EV, Ojeda A, Vera A (1999b):

Aislamiento e identificación de *Malassezia* spp. en pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana

Rev. Iberoam. Micol. 16: 16-21

Crowe JS (1991):

Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion

Nucleic Acids Res. January 11; 19(1): 184

Curvale-Fauchet N, Botterel F, Legrand P, Guillot J, Bretagne S (2004):

Frequency of intravascular catheter colonization by *Malassezia* spp. In adult patients

Mycoses 47: 491-494

Dawson TL (2007):

Malassezia globosa und *restricta*: breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis

J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 12: 15-19

De Bellis F, Castella G, Cabanes FJ, Bond R (2010):

Absence of DNA sequence diversity of the intergenic spacer 1 region in *Malassezia nana* isolates from cats

Med. Mycol. Mar; 48(2): 427-9

Devlin RK (2006):

Invasive fungal infections caused by *Candida* and *Malassezia* species in the neonatal intensive care unit

Adv. Neonatal Care 6: 68-77

Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H (1974):

Proteinase K from *Tritirachium album* Limber.

Eur. J. Biochem. 47 (1): 91–7

Einsele H, Hebart H, Roller G (1997):

Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes

J. Clin. Microbiol 35: 1353-1360

en-wikipedia (2014): http://en.wikipedia.org/wiki/Proteinase_K

Faergemann J (2000):

Management of seborrheic dermatitis and pityriasis versicolor

Am. J. Clin. Dermatol. (2): 75-80, Mar-Apr

Faergemann J, Meinhof W (1988):

Pityrosporum-Folliculitis

Akt. Dermatol. 14: 400-403

Faergemann J, Johansson S, Bäck O, Scheynius A 1986:

An immunologic and cultural study of Pityrosporum folliculitis

J. Am. Acad. Dermatol. 14: 429-433

Faergemann, J, Aly, R, Maibach, HI (1983):

Quantitative Variations in Distribution of Pityrosporum orbiculare on Clinically Normal Skin

Acta. Derm. Venereol. (Stockh) 63: 346-348

Faergemann J, Fredriksson T (1980):

Age incidence of Pityrosporum orbiculare on human skin

Acta. Derm. Venerol. 60: 531-533

Fassler J, Cooper P. BLAST Glossary. 2011 Jul 14. In: BLAST® Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>

Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A (2012):

The *Malassezia* Genus in Skin and systemic diseases

Clin. Microbiol. Rev. January 25(1): 106-141

Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A. (2009):

The range of molecular methods for typing *Malassezia*.

Curr. Opin. Infect Dis. Apr; 22(2): 119-25

Gaitanis G, Velegraki A, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, Katsambas A, Legatis NJ (2002):

Identification of *Malassezia* species from skin scales by PCR-RFLP

Clin. Microbiol. Infect 8: 162–173

Gaskell GJ, Carter DA, Britton WJ, Tovey ER, Benyon FHL, Lovborg Y (1997):

Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi

Electrophoresis 18: 1567-1569

Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson TL Jr (2002):

Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* species on human skin and application of the method to dandruff microbiology

J. Clin. Microbiol. 40: 3350-3357

Gioti A et al. (2013):

Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*

MBio. Jan 22; 4(1): e00572-12

Goldenberg G (2013):

Optimizing treatment approaches in seborrheic dermatitis

J. Clin. Aesthet. Dermatol. February; 6(2): 44-49

Gonzalez A, Sierra R, Cardenas ME, Grajales A, Restrepo S, Cepero de Garcia MC, Celis A (2009):

Physiological and molecular characterization of atypical isolates of *Malassezia furfur*

J. Clin. Microbiol. 47(1): 48-53

Gonzalez IL, Chambers C, Gorski JL, Stambolian D, Schmickel RD, Sylvester JE (1990):
Sequence und structure correlation of human ribosomal transcribed spacers
J. Mol. Biol. 212: 27-35

Gonzalez-Salgado A, Gonzalez-Jaen T, Vazquez C, Patino B (2008):
Highly sensitiv PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour
Food Addit Contam. Jun. 25(6): 758-764

Gueho E, Midgley G, Guillot J (1996):
The Genus *Malassezia* with description of four new spezies
Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-355

Gueho E, SA Meyer (1989):
A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison
Antonie van Leeuwenhock 55: 245-251

Guillot J, Gueho E (1995):
The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA
comparisons
Antonie Leeuwenhock 67: 297-314

Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Gueho E (2000):
A single PCR-Restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species
Lett. Appl. Microbiol. 31: 400-3

Gupta AK, Kohli Y, Li A, Faergemann J, Summerbell RC (2000):
In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole,
itraconazole and terbinafine.
Br. J. Dermatol. 142: 758-65.

Gupta KA, Kohli Y, Summerbell RC (2000):
Molecular Differentiation of seven *Malassezia* species
Vol. 38, No 5: 1869-1875

Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Faergemann J (2003):

Pityriasis versicolor.

Dermatol. Clin. 21(3): 413-429, Jul

Gupta KA, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R (2004):

Identification and Typing of *Malassezia* Species by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of Internal Transcribed Spacer and Large-Subunit Regions of Ribosomal DNA

J. of Clin. Microbiol. Vol. 42, No 9: 4253-4260

Hagler AN, Ahearn DG (1981):

Rapid diazonium blue B test to detect basidiomycetous yeasts

Int. Syst. J. Bacteriol. 31: 204-208

Hennequin C, Abachin E, Symoens F (1999):

Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing

J. Clin. Microbiol. 37: 3586-3589

Hilz H (1975):

Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of "masked" proteins

Eur. J. Biochem. 56: 103-108

Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A (2004):

Malassezia nana sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 623-627

Hort W, Mayser P (2011):

Malassezia virulence determinants

Curr. Opin. Infect. Dis. 24: 100-105

Hort W, Nilles M, Mayser P (2006):

Malassezia-Hefen und ihre Bedeutung in der Dermatologie

Hautarzt 57: 633–645

Ingham E, Cunningham AC (1993):

Malassezia furfur

J. Med. Vet. Mycol. 31: 265-88

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME (2002):

Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens

Med. Mycol. 40(1): 87-109

Jacinto-Jamora S, Tamesis J, Katigbak ML (1991):

Pityrosporum folliculitis in the Philippines: diagnosis, prevalence and management

J. Am. Acad. Dermatol. 24: 693-696

Joseph N, Krauskopf E, Vera MI, Michot B (1999):

Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast

Nucleic. Acids Res. 27: 4533-4540

Kaneko T, Murotani M, Ohkusu K, Sugita T, Makimura K (2012):

Genetic and biological features of catheter-associated *Malassezia furfur* from hospitalized adults

Med. Mycol. Jan; 50(1): 74-80

Kaneko T (2011):

A study of culture-based easy identification system for *Malassezia*

Med. Mycol. J. 52(4): 297-303

Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S, Okamura N (2007):

Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species

J. Clin. Microbiol. 45(11): 3737-42

Kano R, Aizawa T, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A (1999):

Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species

Microbiol. Immunol. 43(8): 813-5

Keddie FM (1966):

Electron microscopy of *Malassezia fufur* in tinea versicolor

Sabouraudia 5: 134-137

Kim D, Lim YR, Ohk SO, Kim BJ, Chun YJ (2011):

Functional expression and characterization of CYP51 from dandruff-causing *Malassezia globosa*

FEMS Yeast Res. 11: 80-87

Kiuchi A, Taharaguchi S, Hanazawa R, Hara M, Ikeda T, Tabuchi K (1992):

Chromosome-sized DNA of *Malassezia pachydermatis* by Pulsed-field gel electrophoresis

J. Vet. Med. Sci. 54: 1219-1220

Ko JH, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ (2011):

Epidemiologic study of *Malassezia* Yeasts in patients with *Malassezia* Folliculitis by 26S rDNA PCR-RFLP analysis

Ann. Dermatol. May; 23(2): 177-84

Koike A, Kano R, Nagata M, Chen C, Hwang CY, Hasegawa A, Kamata H (2013):

Genotyping of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine healthy skin and lesional skin of atopic dermatitis in Japan, Korea, and Taiwan

J Vet Med Sci. Jul 31;75(7):955-8. Epub 2013 Feb 14.

Kurtzmann CP, Fell JW (2000):

The Yeasts, the taxonomic study

4th edn. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam

Kurtzmann BP, Robnett CJ (1997):

Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5`end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene

J. Clin. Microbiol. 35: 1216-1223

Landgraf, VFW (2007):

Physiologisch-biochemische und genetische Charakterisierung der Spezies *Malassezia pachydermatis* unter besonderer Berücksichtigung einer pigmentbildenden Subgruppe

URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-45341

URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4534/>

Landlinger C, Preuner S, Wilinger B, Haberpursch B, Racil Z, Mayer J, Lion T (2009):

Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology

J. Clin. Microbiol. 47(4): 1063-73

Landlinger C, Baskova L, Preuner S, Willinger B, Buchta V, Lion T (2008):

Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.: Dec 23

Leeming JP, Notman FH (1987):

Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin

J. Clin. Microbiol. 25: 2017-2019

Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, Barton R, Su S, Chang TC (2008):

Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions

J. med. Microbiol. May 57(Pt5): 592-600

Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF (1995):

Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources

J. Clin. Microbiol. 33: 1815-1821

LoBuglio KF, Pitt JI, Taylor JW (1993):

Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*

Mycologia 85: 592-604

Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E (1993):

Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species

Yeast 9: 1199-1206

Lyakhovitsky A, Shemer A, Amichai B (2013):

Molecular analysis of *Malassezia* species isolated from israeli patients with pityriasis versicolor

Int. J. Dermatol. Feb; 52(2): 231-3

Machado ML (2010):

Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with divers grades of skin lesions

Med. Mycol. 48: 889-892

Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H (1998):

Phylogenetic classification of Trichophyton mentagrophytes complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions

J. Clin. Microbiol. 36: 2629-2633

Makimura K (2000):

Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions

J. Med. Microbiol. Jan. 49(1): 29-35

Marples MJ (1965):

The genus Pityrosporum. In: The Ecology of the Human Skin

Springfield: C.C. Thomas pp. 408-422

Mayser PA, Preuss J (2012):

Pityriasis versicolor: new aspects of an old disease

Hautarzt Nov. 63(11): 859-67

Mayser P, Hort W, Lang S (2008):
Pathogenicity of *Malassezia* Yeasts
The Mycota, Human and animal relationships 6: 115-151

Mayser P (1999):
Beiträge zur Differenzierung der Gattung *Malassezia* und der Pathogenese der
Pityriasis versicolor, Habilitationsschrift
Gießen. Fachverl. Köhler. 340 Seiten.
ISBN 3-934229-03-4

Mayser P (2008):
Hauterkrankungen durch *Malassezia* Hefen
Pharmazeutische Zeitung online: www.PharmazeutischeZeitungonline.de 16/2008

Mayser PA, Sarah K Lang and Wiebke Hort (2006):
Malassezia yeasts and their significance in dermatology
Hautarzt. 57(7): 633-43

Mayser P, Haze P, Pickel M (1997):
Polidocanol sensitivity –a possible tool in the differentiation of *Malassezia* spp..
Mycoses 40: 391-395

Mayser P, Führer D, Schmidt R, Gründer K (1995):
Hydrolysis of fatty acid esters by *Malassezia fufur*: different utilisation depending on alcohol
moiety
Acta. Derm. Venerol. 75: 105-109

McGinley KJ, Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM (1975):
Quantitative microbiology of the sculp in non-dandruff, dandruff, and seborrheic dermatitis
J. Invest. Dermatol. 64: 401-405

Miranda KC, de Araujo CR, Soares AJ, de Aquino Lemos J, Souza LK, do Rosário Rodrigues
Silva M (2006):
Identification of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Goiânia-GO
Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Nov-Dec;39(6):582-3.

Mirhendi H, Makumura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugito T, Yamaguchi H (2005):
A. simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species
J. Microbiol. Meth. 61: 281-284

Mittag H (1994):
Fine structural investigation of *Malassezia fufur*
I. Size and shape of the yeast cells and a consideration of their ploidy
Mycoses 37: 393-399

Mota R, Reifenberger J, Homey B, Prof. Dr. Bruch-Gerharz D (2011):
Malassezia-Follikulitis bei einem immunsupprimierten Patienten
Der Hautarzt October, 62 (10): 725-727

Müller A, Hinrichs W, Wolf W M, Saenger W (1994):
Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution.
J. Biol. Chem. 269: 23108-23111.

Naldi L, Rebora A 2009:
Clinical practice. Seborrheic dermatitis
N. Engl. J. Med. 360: 387-396

NCBI. National Center for Biotechnology Information (US): FAQ. What is the Expect (E) value?
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ#expect

Nazzaro PM, Passi S, Caprilli F, Nazzaro P, Morpurgo G (1976):
Growth requirement and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*
J. Invest. Derm. 66: 178-182

Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage ME (2002):
Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin
Vet. Rec. 150: 395-398

Nenoff P, Reinl P, Haustein U-F (2001):

Der Hefepilz *Malassezia*

Hautarzt 52: 73-86

Nenoff P, Kalinowska-Pujdak A, Schmalreck A. (2007)

Species specific Susceptibility of *Malassezia* against Antifungal Agents in vitro.

Akt Dermatol 2007; 33(1/02): 26-32

O'Donnell K (1992):

Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopatogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Giberella pulicaris*)

Curr. Genet. 22: 213-220

Oh BH, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ (2010):

Epidemiologic study of *Malassezia* yeasts in seborrheic dermatitis patients by analysis of 26 rDNA PCR-RFLP

Ann. Dermatol. 22: 149-155

Okeke CN, Kappe R, Zakikhani S, Nolte O, Sonntag HG (1998):

Ribosomal genes of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* and var. *farcinosum*

Mycoses 41: 355-362

Papavassilis C, Mach KK, Mayser P (1999):

Medium-chain triglycerides inhibit growth of *Malassezia*: implications for prevention of systemic infection

Crit. Care. Med. 27:1781-1786

Park HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ (2012):

Skin characteristics in patients with pityriasis versicolor using non-invasive method, MPA5

Ann. Dermatol. Nov; 24(4): 444-52

Potter BS (1973):

Pityrosporum folliculitis. Report of seven cases and review of the Pityrosporum organism relative to cutaneous disease

Arch. Dermatol. 107: 388-391

Prohic A (2012):

Psoriasis and *Malassezia* Yeasts, Psoriasis – A Systematic Disease.

Dr. Jose O'Daly (Ed), ISBN 978-953-51-0281-6, InTech

Prohic A, Ozegovic L, (2007):

Malassezia species isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor

Mycoses 50: 58-63

Rhie S, Turcios R, Buckley H, Suh B 2000:

Clinical features and treatment of *Malassezia* folliculitis with fluconazole in orthotopic heart transplant recipients

J. Heart Lung Transplant 19: 215-219

Roberts SOB (1969):

Pityriasis versicolor: A clinical and mycological investigation

Br. J. Derm. 81: 315-326

Robin C (1853):

Histoire naturelle des vegetaux parasites

Paris: JB Bailliere

Romano C, Mancianti F, Nardoni S, Ariti G, Caposciutti P, Fimiani M (2013):

Identification of *Malassezia* species isolated from patients with extensive forms of Pityriasis versicolor in Siena, Italy

Rev. Iberoam. Micol. Feb. 19. Pii : S1130-1406(13)00019-3

Saad M, Sugita T, Saeed H, Ahmed A (2013) :

Molecular epidemiology of *Malassezia* globosa and restricta in Sudanese patients with pityriasis versicolor

Mycopathologia Feb; 175(1-2) : 69-74

Saaf AM (2008):

Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes

PLoS One : 3 :e4017

Schütz, M. (2003):

Häufigkeit und Spektrum von *Malassezia*-Hefen im Bereich des Präputialraumes und der Glans penis sowie im Bereich des hinteren Vaginalgewölbes

URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-13342

URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1334/>

Shelly WB, Crissey JT, Robert Willian (1953):

In Classics in Clinical Dermatology

Springfield: Charles C Thomas: 5-18

Shifrine M, Marr AG (1963):

The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*

J. Gen. Microbiol. 32: 263-270

Simmons RB, Guheo E (1990):

A new species of *Malassezia*

Mycol. Res. 94: 1146-1149

Slooff WC (1970):

Genus *Pityrosporum* Sabouraud

In: The Yeasts-A Taxonomic Study (Hrsg. J. Lodder) 2nd edition

Amsterdam: North-Holland Publish Company ,pp 1167-1186

Smith KJ, Skelton HG, Yaeger J (1994):

A 42-month prospective study. Military Medical consortium for the Advancement of Retroviral Research (MMCARR)

J. Am Acad. Dermatol. 31: 648-655

- Sosa MD, Rojas F, Mangiaterra M, Giusiano G (2013):
Prevalence of *Malassezia* species associated with seborrheic dermatitis lesions in patients in Argentina
Rev. Iberoam. Micol. Mar. 14. Doi:pii S1130-1406(13)00021-1
- Sugita T, Zhang E, Tanaka T, Nishikawa A, Tajima M, Tsuboi R (2013):
Recent advances in research on *Malassezia* microbiota in humans
Med. Mycol. J. 54(1): 39-44
- Sugita T, Tajima M, Ito T, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A (2005):
Antifungal Activities of Tacrolimus and Azole Agents against the Eleven Currently Accepted *Malassezia* Species.
J. Clin. Microbiol. 43: 2824-2829
- Sugita T, Takeo K, Hama K, Virtudazo E, Takashima M, Nishikawa A, Kucsera J, Dorogi J, Komori S, Nakagaki K, Vollekova A, Slavikova E, Farkas V (2005a):
DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals
Med. Mycol. Feb;43(1): 21-6
- Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A (2004):
A new yeast, *M. yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis and its distribution in patients and healthy subjects
Microbiol. Immunol. 48: 579-583
- Sugita TM, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Takeuchi S, Nishikawa A (2003a):
The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis
Microbiol. Immunol. 47: 945-950
- Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A (2003b):
Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects
J. Clin. Microbiol. 41: 4695-4699

- Sugita T, Kodama M, Saito M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Nishikawa A (2003c):
Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA of *Malassezia globosa*
colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals
J. Clin. Microbiol. 43: 3022-3027
- Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A
(2002):
New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis
J. Clin. Microbiol. 40: 1363-1367
- Sugita T, Suto H, Unno T (2001):
Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and
healthy subjects
J. Clin. Microbiol. 39: 3486-90
- Shuster S (1984):
The aetiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents
Br. J. Dermatol. 111: 235-242
- Sunenshine PJ, Schwartz RA, Janniger CK (1998):
Tinea versicolor
Int. J. Dermatol. 37: 648-655
- Swift, JA, Dunbar SF (1965):
The ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *Pityrosporum canis*
Nature 206: 1174-1175
- Szymanski M, Barciszewski MZ, Barciszewski J, Erdmann VA (2000):
5S ribosomal RNA database Y2K
Nucleic Acids Res. 28: 166-167
- Theelen B, Silvestri M, Guého E, van Belkum A, Boekhout T (2001):
Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism
(AFLPTm), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel
electrophoresis (DGGE)

FEMS Yeast Res. 1:79-86

Thoma W, Krämer HJ, Mayser P (2005)

Pityriasis versicolor alba

J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. Mar; 19(2): 147-52

Thompson E, Colvin JR (1972):

Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozzero) Castellani & Chalmers

Can. J. Microbiol. 16: 223-237 (21)

Tietz HJ, Nenoff P, Kerkmann ML, UF Haustein (1999):

Mykologische Laboratoriumsdiagnostik

Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft (DMyKG), Leipzig November 1999,23: 5

Trabelsi S, Oueslati J, Fekih N, Kamoun MR, Khaled S (2010):

Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor

La Tunisie Médicale Vol 88(n°02): 85-87

Uijthof JMJ, Van Belkum A, De Hoog GS, Haase G (1998):

Exophiala dermatitidis and *Sarcinomyces phaeomuriformis*: ITS1-sequencing and nutritional physiology

Med. Mycol. 36: 143-151

Van Abbe NJ (1964):

The investigation of dandruff

J. Soc. Cosm. Chemists 15: 609-630

Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R (1991):

Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes

Acids Res. 19: 6823-6831

Weary PE (1969):

Acneiform eruption resulting from antibiotic administration

Arch. Dermatol. 100: 179-183

- Wedde M, Müller D, Tintelnot K, De Hoog GS, Stahl U (1998):
PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria*/*Scedosporium* strains
Med. Mycol. 36: 61-67
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990):
Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics
In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods
and Applications. San Diego:
Academic Press: 315-322
- Wiegers U, Hilz H (1971):
A new method using 'proteinase K' to prevent mRNA degradation during isolation from HeLa
cells Biochem. and Biophys.
Res. Commun. 44: 513-519
- Wikipedia (2014). Ethanol-Fällung. <http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Extraktion>
- Wilde PF, Stewart PS (1968):
A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*
Biochem. J. 108: 225-231
- Yeh LC, Lee JC (1990):
Structural analysis of the internal transcribed spacer 2 of the precursor ribosomal RNA from
Saccharomyces cerevisiae
J. Mol. Biol. 211: 699-712
- Zeugin J A, Hartley J L (1985):
Ethanol Precipitation of DNA. In: *Focus* (1985), Band 7(4).
- Zhang H, Ran Y, Xie Z, Zhang R (2013):
Identification of *Malassezia* species in patients with seborrheic dermatitis in China
Mycopathologia Feb; 175(1-2): 83-9

Zomorodain K, Mirhendi H, Tarazooie B, Kordbacheh P, Zeraati H, Nayeri F (2008):
Molecular analysis of *Malassezia* species isolated from hospitalized neonates
Pediatr. Dermatol. 25(3): 312-6

9. Anhang

9.1. Sequenzen der einzelnen Spezies

NR- CBS/ Wild- stamm	Labornamen/ Stamm	Sequenzen
CBS 1	CBS 7222	AACACGTCTCTGGCGCCCCTCACTATATTTCATACCAACCCG GNTGCACTGTGATGACGAATGTCATCGAACAAAAAACT CGTATGGTTGAATGTACGTGAAATTGTAGGTATAGCCTACG AACTATACACAACCTTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
CBS 2	CBS 7979	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGT tGtCGAAAGTtGTGTATAGtTCGTAGGCTATAcCTACAATTTC ACGTACATTCAACCATAACGAGTTTTTTTTTGTTCGATGACAT TCGTCATCACAGTGCACAGGGGTTGGTATGGATATAGTGA TGGGCGCCAGAGACGTGTTTTCGTCCGTATGgCAGGCCCGA aaCTTtCAcTAAtGATCCTTCTGCAGGTTTCAC
PM 3	M. glob	GCGCGCGCGCTCCGCAGTTCGCGCGCGCGCGCGCCGCGCG GGCGCGCGCCGGTAGGCGGCGCGTCCGCGCCGTCCGCGCG GAGACCCGTGGCCCGATCACTAGGCCAACAAATATAACAC AACTAACGACAACGGATCTCT
PM 4	107	TATACATCCATAAACCCGTGTGCACTGTTCTAAGGAGTAAG AAAGAAGAAgaaGGGNGAGGGAGAGAGAGTGCATGTGCTT TGCATATAACTCTCTCNNACTCTCCACTCTCTTTCTCTCTCT CTCCGGTTAATTACAAACTCGTATGGATTTGTATGAACGTG AGATATATCGTTGGACCGTCACTGG
PM 6	117	CAGTGACGGTCCCCCGAtAtATTcAGTCATaCAAATCCATAC GAGTTTGTAAATTAACCGGAGAGAGAGAGAAAGAGAGTGG AGAGTGAGAGAGAGTATATGCAAAGCACATGCACTCTCTCt CCCtCTCCCtCTCTCCTCCTCTCTTACTCCtTAGAACAGTGCA CACGGGgTTTATGGATGtATAGTGGATGCGAG
PM 8	13	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGT TGTCGAAAGTTGTGTTTTGTTCGTTGGTTGTGAACCAACAT CAATCACGTTTCATACAAACATGCGTGTTTTTAGAGAAGGA AGGCGCCCGGACGCCATTAAGCAATCCAAACGCGCTTCCA CACGGTGCACAGGGTTTGTGGATAAATAGTGGATTGGGGG AGAGGCACGTTGTGTAGCGTGCgTATCTCAAaCCCCAGGCA ATTCATAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAA
PM 10	Roscott	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGT TGTCGAAAGTTGTGTTTTGTTCGTTGGTTGTGAACCAACAT CCATCACGTTTCATACAAACATGCGTGTTTTTAGAGAAGGA AGGCGCCCGGACGCCATTAGCAATCCAAACGCGCTTCCAC ACGGTGCACAGGGTTTGTGGATAAATAGTGGATTGGGGGA GAGGCACGTTGTGTAGCGTGCgTATCTCAAaCCCCAGgCA ATtCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAACC

NR- CBS/ Wild- stamm	Labor- Name/ Stamm	Sequenzen
PM 12	Seibt	GCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTtGtCGA AAGTtGTGTTTTGTTTGTGTTGTGAACCAACATCAATCAC GTTTCATACAAACATGCGTGTTTTTTAGAGGAGAGAAGAGG CAACAAACAAGCAGACCCATGAAAAGGTCGCCATTCGCAA CCTCTTCTCCATACGATGCACAGGGTTTGTGGATAAATAGT GgATTGGGGGAGAGGACGTTGTGTTAGCGTGCGTATCTCA aCCCCAGgCAATtCACTAaTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC GGAaA
PM 14	Brauns	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAaGAgATCcGTt GTCgAAAgTtGTGtATaGTTTCGTAGGCAaAGCcTACAGTTtCAC GTACATaCAACCATACGAGTTTTTTTTGGTTCGATGACTTTTCG CCATCACAGTGCACAGGGGTTGGTGTGGATATAGTGGTGG GCGCCAGARACGCGGTAGCGTCCGTATGGCTGgCCCAaTC TTCACTAATGATCCTTCTgCAGGTTCCACCTACGGAAACC
PM 16	6094	TTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTtGtCGAAaGT tGTAtTATTGGTTGTTGGcCAGTTACGGTCCAACGATTtcCAC GTTTCATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAATGGATTGGAG AGCCAGGCCCTCTTGCGAGGTCCAACCTCATCCAAACGGTGC ACACGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAGTTGGgCGCCAGAGA CgTTGTACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGCCCTTGC TTTCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
PM 18	1639	ATCGATGGGAGAACCAAGAGATCcGTtGtCGAAAGtTGTGTA TAGTGTGgATGtATAGTggGTGTAGGCGGCCAGGgACACTTTt tGgCGTCcGtATGgCcTGCCcAAaTCTTCACTAATGATCCTTCT GCAGGTTACCTACGTTTGTGTTGGCCAGTGACGGTCCAACCA AGTTCcACGtTCATACTAACCATTTCGAGTTtGTAGCGAAGAA AGAcCCCAAGAGAGGCCACaAAAAACTTCTCTGAAGCCTTt CTCCAAGACAGTGcACACGGgTT
PM 20	1647	TTTCCGTAGGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAAAG TTTCGGGCCTGCCATACGGACGCAAACACGTCTCTGGCGCC CATCAcTATATCCATACCAACCCCTGTGCACTGTGATGACG AATGTCATCGAACAAAAAAACTCGTATGGTTGAATGTAC GTGAAATTGTAGGTATAGCCTACGAACCTATACACAACTTTC GaCAaCGGaTCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGC GAA
CBS 22	CBS 7966	CGATATATCTCACGTTTCATACAAATCCATACGgAGTTTGTG TAATTAaACCAGAGAGAGAAAGGAAGAGAAAGAGAGAGA GTTATATGCAAAGCACATGCACTCTCTCCCTCCCCTTCTTTC TACTCCTTAACAGTGCACACGGGtTTATGGATGTATAGTgg ATACGAGCCGCCAGAGACACACTTATTGTACGTCTGTATG GCTGGCCCTTGAATCTTCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTT ACCTACGGA
CBS 24	CBS 9145	TGCACTGTGATGGCGAAAGTCATCGAACCAAAAAAACTCG TATGGTTGTATGTACGTTGAAACTGGTAGGCTTTGCCTACG AACTATACACAACCTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAA

NR,CBS / Wild- stamm	Labor- Name/ Stamm	Sequenzen
CBS 26	CBS 7876	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGT tGtCGAAAGTTgTAtGTTTTGTTTGGCCAGTTACGGTCCA ACGAtTTCCACGTTTCATACAACCATACGAGTTTGTTCaAG AGTTTGAGGGGAAAGCTTCCAAAAGAAAACTTTTCCCCTC AACAGTGTGCACACGGGTTTGTGGATATTGGTGTAAAGTT GGGcGCCcAGAGAACGTTTCACGCGGAGTACGcGCCGTCCG TATGGCAGGCCCTTGCTTTCACTAATGATCCTTCTGCAGGT TCACCCTACGGAAACC
CBS 28	CBS 7861	TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGT TGTCGAAAGTTGTGTTTTGTTCGTTGGTTGTGAACCAACAT CAATCACGTTTCATACAAACATGCGTGTTTTTAGAGAAGGA AGGCGCCCCGGACGCCATTAAGCAATCCAAACGCGCTTCCA CACGGTGCACAGGGTTTGTGGATAAATAGTGGATTGGGGG AGAGGCACGTTGTGTAGCGTGCGTATCTCAAACCCAGCC AATTCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAACC
CBS 30	CBS 7019	TCATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAATGGATTGGAGAG CCAGGCCTCTTGCGAGGTCCAACCTCATCCAAACGGTGCAC ACGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAGTTGGGCGCCAGAGAC GTTGTACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGCCCTTGCT TTCATAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAACCCA
CBS 32	CBS 4162	ATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGTA TTATTGGTTGTTGGCCAGTTACGGTCCAACGATTTCcACgTT CATaCAAAcCATACGAGTTTGGTAGAAATGGATTGGAGAGC CGAGCCTCTTGCGAGGTCCAACCTCATCCAAACGGTGCACA CGGGTTTGTGGATATTGTGTAAaGTTGGgCGCCAGAGACGT GTACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGGCCTTGCTTT
CBS 34	4170	CGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTT GTCGAAAGTTGTATTATTGGTTGTTGGCcAGTTACGGTCCAa CGATTTCCAcgTTCATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAAT GGATTGGAGAGCCAGGCCTCTTGCGAGGTCCAACCTCATCC AAACGgTGCACACGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAGTTGGG CGCCAGaGACGTTGTACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCT GGCCCTTGCTTTCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTA CGGAAACC
CBS 36	4171	CCACGTTCAAtAcAaCCATaCGaGTTTGGTAGAAaTGGaTTGGA GaGCCaGgCCTCTTGCGaGGTCCAaCTCATCCaaaCGGTGCAC ACGGGtTTGTGGATATTGTGTAAAGTtgggCGCCAGAGACGT TGtACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGCCCTTGCTTT CACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAA
CBS 38	CBS 6000	TTCTTCATCGATGGGAGAACcAAGAgAtCCGTtGTCGAAAGT TgtATtATTGgTTGTTGGCcAGTTACGGtCcAaCGAtTTCCACGT TCATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAATGGATTGGAGAG CCAGGCcTCTTGCGAGGTcCAACTCATCCAAACGGTGCACA CGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAAGTTGGGCGCCaGAAGAC GTTGTACGCGAgTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGCCCTTGCT TTCATAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG

NR- CBS/ Wild- stamm	Labor- name	Sequenzen
CBS 40	CBS 6046	CCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGTATTATTGGTTGTTGG CCAGTTACGGTCCAAcGATTTCcAcgTTCATACAACCATACG AGTTTGGTAGAAATGGATTGGAGAGCCAGGCCTCTTGCGA GGTCCAACTCATCCAAACGgTGCACACGGgTTTGTgGATATT GTGTAAAGTTGggCGCCAGAGACGTtGTACGCGAgTAGCGC CGTCCGTATGGCTGGCCCTTGCTTTCACTAATGATCCTTCT GCAG
PM 42	312	ATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGTA TTATTGGTTGTTGGCCAGTTACGGTCCAAcGATTTCcAcgTTC ATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAATGGATTGGAGAGCC AGGCcTCTGCGAGGTCCAACTCATCCAAACGGTGCACACG GGTTTGTGGATATTGTGTAAaGTtGGgCGCCAGAGACGTtGT ACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGCCCTTGCTTTCAC TAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAA
CBS 44	EG 658	CGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTT GTCGAAAGTTGTATTATTGGTTGTTGGCCAGTTACGGTCCA ACGATTTCCACGTTTCATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAA TGGATTGGAGAGCCGAGCCTCTTGCGAGGTCCAACTCATC CAAACGGTGCACACGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAGTTG GGCGCCAGAGACGTTGTACGCGAGTAGCGCcGTCCGTATG GCTGgCCCTtGCTTtCacTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCT
PM 46	Z2	CGCGTCACGTCCTGGCGCTTAACCTTTACACAATATCCACAA ACCCGTGTGCACCGGTTTGGATGAGTTGGACCTCGCAAGA GGCCTGGGCTCTCCAATCCATTTCTACCAAACTCGTATGG TTGTATGAACGTGGAAATCGTTGGACCGTAACTGGCCAAC AACCAATAATACAACTTTCGACAACGGATCTCTTGGTT
PM 48	M. glob	GCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCG AAAGTTGTGTATAGTTCGTAGGCtATaCCTACAAttCACGTa CATtCaACCATACGAGtTTTTTTTTGTTTCGATGACAtTCGTCAT CACAGTGCACAGGGGTTGGTATGGATATAGtGATGGGCGCC AGAgACGTGTTTGCGTCCG
PM 50	1414/04	CACGTCTCTGGCGCCATCACTATATCCATATTAACCCCTGT GCACTGTGATGACGAATGTCATCGAACAAAAAAAAAACTCG TATGGTTGAATGTACGTGAAAATTGGTAGGTATAGCCTAC GAACTATACACAACCTTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCC CATCGATGAAGAACGCA
PM 52	1399/04	GAAAGTTGTGTATAGTTCGTAGGcTATACTACAATTTACAG TACATTCAACCATACGAGTTTTTTTTTGTTCGATGACATTTCG TCATCACAGTGCACAGGGGTTGgTATGGATATAGtGATGGG CGCCAGAgACGTGTTTGCCTCCGTATGGCAGGCCCGAAACT TTCATAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAAACC

NR- CBS/ Wild- stamm	Labor- Name/ CBS- .Stamm	Sequenzen
PM 54	114	ATCGATGGGAGACCAAGAgAtCGTtGTgAAGTGTGTATAGTT tGTtGGCCAGTGACGGTCCAACCAAGTTCCACGaTTCATACT AACCATTTCGAGTTTGTAGTcGAGGAAAGGGCCTCAGAGAG ACCAAGCCAGAGATCAACGCTCCAACGCGACGGATCGCAC TGTTACTCGCTTCTCTCTTCCTTTTTCTCTCCAAaTGCCCTTT CCAAGGATCAGTGCACACGGGTTTGTGgATGTATAGTGGGt GTAGGCGGCCAGGGACACTTTGTGGCGTTCGTATGGCCCT GCCCAAATCTTCTACTAATGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC GGA
PM 56	115	GGCCAGTGACGGCAACCAAGCCCACGTTCATACTAACCAT TCGAGTTTGTAGCGAAGAAAGACCCCAAGAGAGGCCACAA AAAACTTCTCTGAAGCCTTTCTCCAAGACAGTGCACACGG GTTTGTGGATGTATAGTGGGTGTAGGCGGCCAGGGACACT TTTTGGCGTCCGTATGGCCTGCCCAAATCTTCTACTAATGAT CCTTCTGCAGGTTCACCTACGGAA
CBS 58	CBS 7877	GTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGAtCCGTtGTCgAAaG TTgTGTATAGTTtGTTGGCcAGTGACGGtCCAACCAAGTTCCA CGTTCATACTAACCATTTCGAGTTTGTAGCGAAGAaGAcCCC AAGAGAGGCCACAAAAAACTTCTCTGAAGCCTTTCTCCAA GACAgGTGCACACGGGGTTTGTGGATGTATAGTGGGTGTA GGCGGCCAGGGACACTTTTTGGCGTCCGTATGGCCTGCCCA AATCTTCTACTAATGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC
CBS 60	CBS 1892	CATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTGCGAAAGTTGT ATAAAGTTTGTGTTGGCcAGTGACGGtCcAACGtTTACAACGT ACATACAACCATACGAGTTTGTGTTGAATGCGTGCCTCGCC CATACAGGCCAAAGCAACACAAGTGCACACGGGTTTGTGG ATGTATAGTGGGTTGGGCGCCAGAGACGCTTGCGCATCCG TATGGCAGGCCCTACAAATCTACTAATGATCCTTCTGCAGG TTCACCTAC
PM 62	Beiß	GGCCAGTGACGGtCCAACGATATATCTCACgTTCATACAAA TCCATACGAGTTTGTAAATTAACCGGAGAGAGaAAGAGAGT GGAGAGCGAGAGAGAGTTATATGCAAAGCACATGCACTCT CTCTCTCCCCTCCCCTTCTTCTTTCTTACTCCTTAGAACAGT GCACACGGgTTTATGGATGTATAGTGGATGCGAGCCGCCA GAGACACACTTATTGTACGTCTGTATGGCTGGCCCTTGAAT CTTCTACTAATGATCCTTCTGCAGGTTCACCTACGGA
CBS 64	ATCC No 42132	TGCACTGTGATGGCGAAAGTCATCGAACCAAAAAAACTCG TATGGTTGTATGTACGTTGAAACTGGTAGGCTTTGCCTACG AACTATACACAACTTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAA

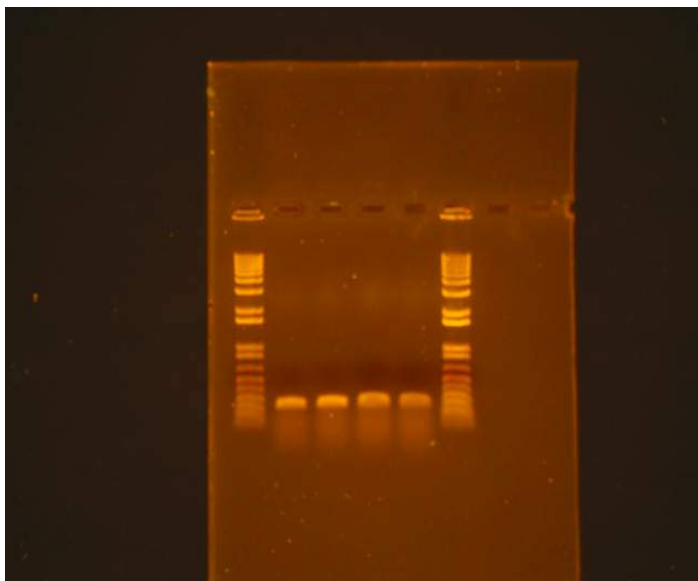
NR- CBS-/ Wild- stamm	Labor- Name/ CBS- Stamm	Sequenzen
PM 66	Weber/glo	TTCTTCATCGATGGGAGAAccAAGAGAACcGTtGtCGAAGCtG TGTTATaTTTGTtGGCAGTGACGGtCCACGATATATCTCACG TTCATACAAATCCATACGAGTTTGTAAATTAACCGGAGAGA GAAAGAGAGTGAGAGTGAGAGAGTTATATGCAAAGCACACA TGCACTCTCTCTCCCTCCCTTCTTCTTTCTTAcTCCTTAGAAC AGTGCACACGGGTTTATGGATGTATAGtGGATGCGAGCCGC CAGAGACACACTTATTGTACGT
PM 68	119/04	CATACGAGTATTTGGAGGTCGATGACATTCGTCATCACAGC TGCACAGGGGTTGGTATGGATATAGTGATGGGCGCCAGAG ACGTGTATGCGTCCGTATGGCAGGCCCCGAAACTTTCACTAA TGATCCTTCTGCAGGTTCAACTACGGAAACC
PM 70	Kreuz	TCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAG TTGTATTATTGGTTGTTGGCCAGTTACGGTCCAACGATTTC CACGTTTCATACAACCATACGAGTTTGGTAGAAATGGATTG GAGAGTCTGCcTCGCGAGGAGGcCTACTCATCCAAACGGTG CACACGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAGTAAAGCGCCAGA GACGTGTACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGCTGGACCTT GCTTTCTCTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
PM 72	NN5	GCACTGTGATGACGAATGTCATCGAACAAAAAAACTCGT ATGGTTGAATGTACGTGAAATTGTAGGTATAGCCTACGAA CTATACACAACTTTCGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCAT CGATGAAGAACGCAGCGAA
PM 74	12	CATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGT GTTATATTTGTTGGCCAGTGACGGTCCAACGATATATcTeAC GTTTCATACAAATCCATACGAGTTTGTGTAAATTAACCcAGAG AGAGAgAAGGAAGAGAAAGAGAGAGAGTTATATGCAAAG CACATGCACTCTCTCCCTCCCCTTCTTTCTTACTCCTTAACc AGTGCACACGGGTTTATGGATGTATAGTGgaTACGAGCCGC CAGAGACACACTTATTGTACGTCTGTATGGCTGGCCCTTGA ATCTTCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
PM 76	17	GGTCCAGAACTACAGACGTACACTAAGTGTGTCTCTGCCG GCTCGVaTccACTATACaTCcATtAACCCGTGTgCACTGTtCcTA aGGAGTAAGAAGAAgAACgAAGGGGgAgGGAGAGAGAGTG CATGTGcTTGCATATAACTCTCTCACTCTCCACTCTCTTTCT CtCgTCTCTCcGGTTATTACAAACcTCGTAcTGGATTtGTATG
PM 78	700/03	CGCCACCATATATTACACAACCTGTGCACGTGATGGCGAA AGTATCGAACAAAAAACTCGTATGGTGTATGTACGTGAAA TGTAGGCTTGCCTACGAACCTATACACAACCTTCGACAACGG ATCTCTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCG
PM 80	871/04	CATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTCGAAAGTTGT GTTATATTTGTTGGCCAGTGACGGTCCAACGATATATCTCA CGTTCATACAAATCCATACgGAGTTTGTAAATTAACCGGAGA GAGAAAGAGAGTGAGAGAGTTATATGCAAAGCACATGCA CTCTCTCTTCTTCTTTCTTACTCCTTAGAACAGTGCACACGG GTTTATGGATGTATAGTggATGCGAgCCGCCAGAGACACAC TTATTGTACGTCTGTATGGCTGGCCCTTGAATCTTCACTAA TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGA

NR- CBS-/ Wild- stamm	Labor- Name/ CBS- Stamm	Sequenzen
CBS 82	CBS 1878	CGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAACCAAGAGATCCGTT GTCGAAAGTTGTATTATTGGTTGTTGGCCAGTTACGGTCCA AcGaTTTCcACgTTCATACAACCATAACGAGTTTGGTAGAAAT GGATTGGAGAGCCAGGCCTCTTGCGAGGTCCAACATCATCC AAACGGTGCACACGGGTTTGTGGATATTGTGTAAAGTTGG GCgCcAGaGACGTTGTACGCGAGTAGCGCCGTCCGTATGGC TGGCCCTTGCTTTCACTAATGATCCTTCTGCAGGTTACCT ACGGAAACC

9.2. Photodokumentation

Hier wird die Überprüfung der PCR-Produkte der untersuchten *Malassezia*-Stämme per Gel-Elektrophorese dargestellt. Links und rechts auf den Agarose-Gelen befinden sich die DNA-Leitern, welche als Marker bei der Gelelektrophorese verwendet werden, um sowohl die Größen der Produkte zu bestimmen als auch die zu untersuchenden DNA-Stränge grob zu quantifizieren. Zwischen den Leitern sind die PCR-Produkte der unterschiedlichen *Malassezia*-Stämme mit ihren individuellen Banden zu erkennen.

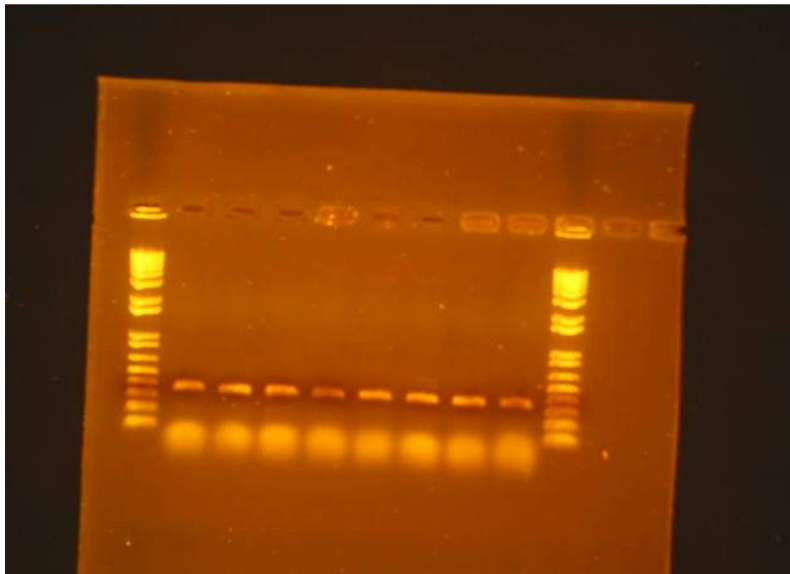
Photodokumentation vom 06.10.04 mit den Banden von:



1,1,2,2 (von links nach rechts)

- | | | |
|---|------|-------------------------------------|
| 1 | 7222 | Referenzstamm <i>M. sympodialis</i> |
| 2 | 7979 | Referenzstamm <i>M. sympodialis</i> |

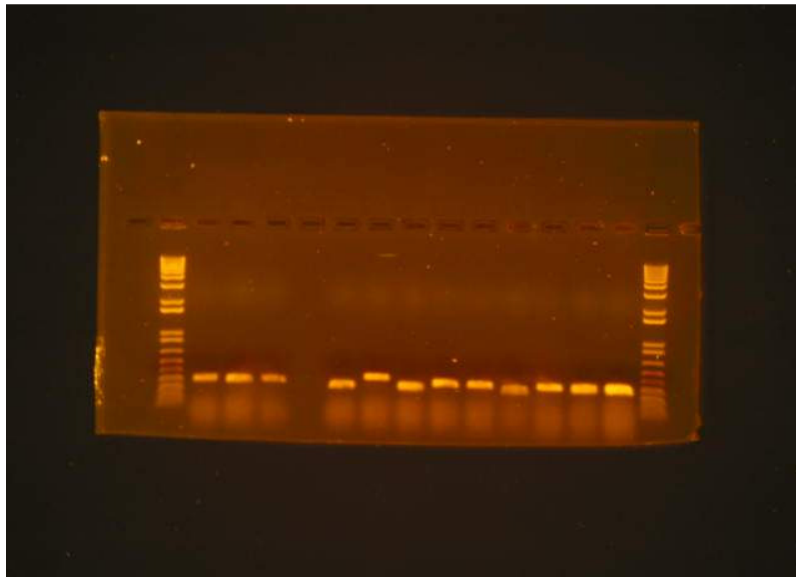
Photodokumentation vom 08.10.04 mit den Banden von:



3,4,5,6,3a,4a,5a,6a (von links nach rechts)

3/3a	M. globosa	Wildstamm <i>M. globosa</i>
4/4a	107	Wildstamm <i>M. globosa</i>
5/5a	107	Wildstamm <i>M. globosa</i>
6/6a	117	Wildstamm <i>M. globosa</i>

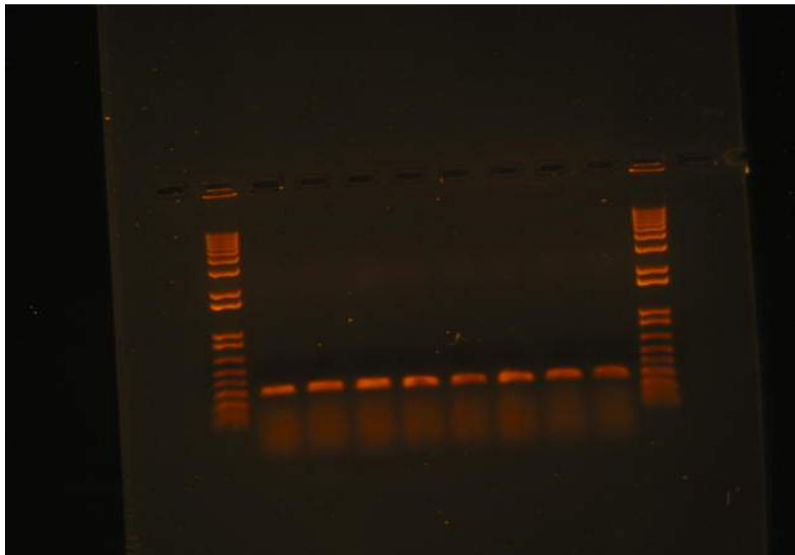
Photodokumentation vom 26.10.04 mit den Banden von:



PM 8 bis PM 30

PM	8	13	Wildstamm	<i>M. slooffiae</i>
PM	10	Roscott	Wildstamm	<i>M. slooffiae</i>
PM	12	Seibt	Wildstamm	<i>M. slooffiae</i>
PM	14	Brauns	Wildstamm	<i>M. slooffiae</i>
PM	16	6094	Wildstamm	<i>M. furfur</i>
PM	18	1639	Wildstamm	<i>M. restricta</i>
PM	20	1647	Wildstamm	<i>M. sympodialis</i>
CBS	22	7966	Referenzstamm	<i>M. globosa</i>
CBS	24	9145	Referenzstamm	<i>M. dermatitis</i>
CBS	26	7876	Referenzstamm	<i>M. obtusa</i>
CBS	28	7861	Referenzstamm	<i>M. slooffiae</i>
CBS	30	7019	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>

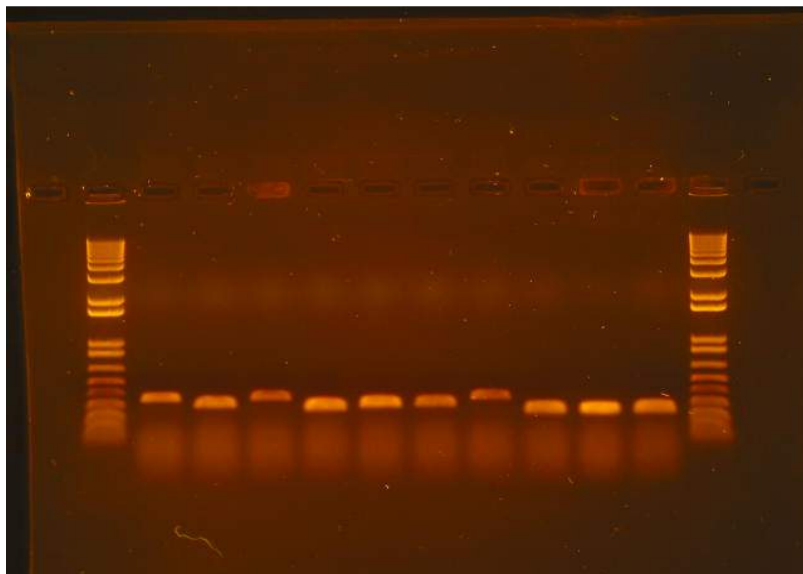
Photodokumentation vom 05.11.04 mit Banden von:



PM 32 bis PM 46 (von links nach rechts)

CBS 32	4162	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
CBS 34	4170	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
CBS 36	4171	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
CBS 38	6000	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
CBS 40	6046	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
PM 42	312	Wildstamm	<i>M. furfur</i>
CBS 44	EG 658	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
PM 46	Z2	Wildstamm	<i>M. furfur</i>

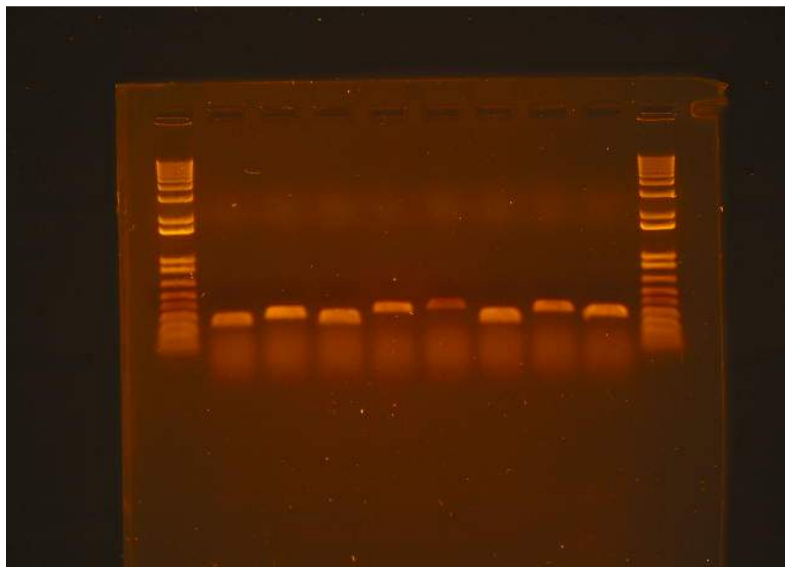
Photodokumentation vom 10.12.04 mit den Banden von:



PM 66 bis PM 48 (von links nach rechts)

PM 48	<i>M. globosa</i> von Förste	Wildstamm	<i>M. globosa</i>
PM 50	1414/04	Wildstamm	<i>M. sympodialis</i>
PM 52	1399/04	Wildstamm	<i>M. sympodialis</i>
PM 54	114	Wildstamm	<i>M. restricta</i>
PM 56	115	Wildstamm	<i>M. restricta</i>
CBS 58	7877	Referenzstamm	<i>M. restricta</i>
CBS 60	1892	Referenzstamm	<i>M. pachydermatis</i>
PM 62	Beiß	Wildstamm	<i>M. globosa</i>
CBS 64	42 132	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>
PM 66	Weber	Wildstamm	<i>M. dermatis</i>

Photodokumentation vom 16.12.04 mit den Banden von:



PM 68 bis PM 82 (von links nach rechts)

PM 68	119/04	Wildstamm	<i>M. sympodialis</i>
PM 70	Kreuz	Wildstamm	<i>M. furfur</i>
PM 72	NN5	Wildstamm	<i>M. sympodialis</i>
PM 74	12	Wildstamm	<i>M. globosa</i>
PM 76	17	Wildstamm	<i>M. globosa</i>
PM 78	700/03	Wildstamm	<i>M. dermatis</i>
PM 80	871/04	Wildstamm	<i>M. globosa</i>
CBS 82	CBS 1878	Referenzstamm	<i>M. furfur</i>

10. Danksagung

Diese Dissertation wäre nicht ohne breite Hilfe und Unterstützung zustande gekommen.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Peter Mayser für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Aufgabenstellung, sowie Dr. med. Wiebke Hort und Dr. Hans-Joachim Krämer für die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft und diverse Anregungen. Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Virologie, Frankfurterstr 107, Tel.: 0641/9941201 in Gießen für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Frau Stefanie Gutsuz danke ich für die enge Zusammenarbeit gerade im Zeitraum während des Methodenvergleiches, die Bereitstellung ihrer Daten und Unterlagen auch für die Nutzung im Rahmen der Verfahrensevaluation in der vorliegenden Inauguraldissertationsarbeit, der immerwährenden Ansprechbarkeit für Rückfragen sowie Ihre Freundschaft. Große Unterstützung erhielt ich außerdem von meinem Ehemann Dr. med. Holger Uhlich und meinen Eltern.

.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Erklärung:

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6240-8

